



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

ALTERACIONES CARDIOVASCULARES GENERADAS POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A CADMIO

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
MIGUEL ANGEL GARCÍA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ GUSTAVO LÓPEZ Y LÓPEZ

ASESOR DE TESIS:
DR. FAUSTO ATONAL FLORES

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Farmacia Clínica de la Facultad de
Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Miguel Angel García González fue becario del programa Beca-Tesis Concytep
2014.

*“Empieza haciendo lo necesario, después lo posible, y de repente te
encontrarás haciendo lo imposible.”*

San Francisco de Asís

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo y cariño que me han brindado, no solo en esta etapa, sino a lo largo de toda una vida.

Al Dr. Gustavo quien me abrió las puertas de su laboratorio y me mostró el camino científico.

Al Dr. Fausto quien me apoyó en la última etapa de mi formación profesional, con consejos y observaciones siempre puntuales. Por todo su trabajo, pero sobre todo por esa gran amistad.

A mis revisores de tesis: MC Celeste, MC Aldrin y LF Juan Carlos, por su disposición y apoyo.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. La hipertensión es un factor de riesgo para complicaciones cardiovasculares ampliamente estudiada; sin embargo, existen factores de riesgo emergentes como la intoxicación por cadmio (Cd^{2+}). El Cd^{2+} es un metal pesado que afecta algunos sistemas del organismo como consecuencia de la contaminación ambiental, consumo de alimentos contaminados y principalmente por el consumo de cigarro a través del cual se inhala hasta 1.7 μg de este metal. El Cd^{2+} se acumula en órganos como hígado, pulmones y riñones. Evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la exposición a Cd^{2+} induce diversos cambios adversos en el sistema cardiovascular especialmente sobre el sistema de conducción, además de daño estructural del miocardio, aumento del volumen sistólico, gasto cardiaco y presión arterial. Estos cambios han sido asociados al incremento del estrés oxidativo y especialmente se ha involucrado al endotelio vascular como órgano diana en las complicaciones de la toxicidad por Cd^{2+} . Es aceptado que la disfunción endotelial es trascendental en las complicaciones cardiovasculares de enfermedades como la Diabetes Mellitus donde el daño al endotelio se atribuye al incremento del estrés oxidativo por sobreexpresión de la NADPH oxidasa. En este contexto, consideramos que si el Cd^{2+} favorece un estado de estrés oxidativo a nivel vascular entonces la disfunción endotelial resultante podría afectar el funcionamiento basal de la regulación del sistema nervioso autónomo sobre el corazón. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la exposición crónica a Cd^{2+} sobre la relajación de la aorta dependiente de óxido nítrico y sobre el balance simpático vagal cardiaco. Ratas macho de la cepa Wistar fueron divididas en dos grupos. Un grupo control tratado con agua normal y un grupo experimental tratado con cadmio en el agua (2 mg/kg) durante 8 semanas *ad libitum*. Se obtuvo registro electrocardiográfico de ambos grupos a las 0, 2, 4, 6 y 8 semanas y se realizó análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) para obtener indicadores del balance simpático vagal. A las 8 semanas, las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia y se aislaron anillos de aorta torácica de 3 mm de longitud. Mediante estudios de reactividad vascular se realizaron curvas concentración respuesta a acetilcolina, nitroprusiato de sodio y fenilefrina en presencia y ausencia de endotelio y de neutralizadores de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos muestran que el Cd^{2+} induce la presencia de disfunción endotelial dependiente del incremento de radicales superóxido y además reduce la VFC debida a una reducción de la modulación parasimpática sobre el nodo sinusal. Este trabajo documenta una relación entre la exposición crónica a Cd^{2+} con la presencia de disfunción endotelial y la disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca. El Cd^{2+} , entonces a través del incremento del estrés oxidativo favorece la presencia de disfunción endotelial, uno de los mecanismos que pueden explicar la disautonomía cardiaca presente como se hace evidente con la disminución de la VFC.

ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina.
α_1	Receptores alfa adrenérgicos tipo 1.
α_2	Receptores alfa adrenérgicos tipo 2.
APO	Apocinina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
ATPasa Na⁺/K⁺.	Bomba de Sodio/Potasio dependiente de ATP
Ca²⁺	Calcio.
Ca²⁺-ATPasa	Bomba de Calcio dependiente de ATP.
Ca²⁺-CaM	Complejo calcio calmodulina.
Ca²⁺-CaM-MLCK	Complejo Calcio-Calmodulina y cinasa de la cadena ligera de la Miosina.
Cd²⁺	Cadmio.
CdMT	Complejo Cadmio-Metalotioneína.
CdGHS	Complejo Cadmio-Glutatión.
CMLV	Células musculares lisas vasculares.
DAG	Diacilglicerol.
E_{max}	Efecto máximo relajante.
ECG	Electrocardiograma.
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa.
FN-kB	Factor nuclear kappa-beta.
FC	Frecuencia cardiaca.
GP₃	Gliceraldehido 3 fosfato.
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.
GCs	Guanilato ciclase soluble.
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico.

GSH	Glutati3n reducido.
HF	Oscilaciones de alta frecuencia
IP₃	Inositol-1, 4, 5-trifosfato.
LF	Oscilaciones de baja frecuencia.
LF/HF	Cociente de baja frecuencia sobre alta frecuencia.
M₂	Receptores muscarinicos tipo 2.
MDA	Malondialdehido.
Mg	Magnesio.
MLC	Cadena ligera de la miosina.
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina.
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.
MT	Metalotioneinas.
NO	3xido n3trico.
NPS	Nitroprusiato de sodio.
OMS	Organizaci3n mundial de la salud.
pD₂	Dosis efectiva 50.
PKC	Prote3na cinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PMCA	Bomba de calcio de la membrana celular.
RMSSD	Ra3z cuadrada de la desviaci3n est3ndar de los intervalos RR.
SDNN	Intervalo entre dos picos RR consecutivos.
DERR	Desviaci3n est3ndar de los intervalos RR.
SERCA	ATPasa de calcio del ret3culo sarcopl3smico.
SOD	Enzima super3xido dismutasa.

UN	Unidades normalizadas.
VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje.
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular.

INDICE

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS

ÍNDICE.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. FARMACOCINÉTICA DEL CADMIO.	2
1.1.1 Absorción.	2
1.1.2 Metabolismo.	3
1.1.3 Eliminación.	4
1.2. Efectos del cadmio en el organismo.	5
1.3. Dosis y tiempo de exposición.	9
1.4. Factores de riesgo.	10
1.5. Manifestaciones clínicas de la intoxicación por cadmio.	10
1.6. Tratamiento y prevención de la intoxicación por cadmio.	11
1.7. Rutas de exposición al cadmio.	13
II. ANTECEDENTES.	14
III. JUSTIFICACIÓN.	17
IV. HIPOTESIS.	20
V. OBJETIVOS.	21
5.1. Objetivo General.	21
5.2. Objetivos Particulares.	21
VI. METODOLOGÍA.	22
6.1. Animales de experimentación.	22

6.2.	Registro de electrocardiograma.	24
6.3.	Obtención de parámetros eléctricos.	24
6.4.	Análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca.	25
6.5.	Análisis estadístico.	26
6.6.	Estudio de la reactividad vascular.	26
	6.6.1. Obtención de tejidos.	26
	6.6.2. Registro de contractilidad.	27
	6.6.3. Curva Concentración Respuesta a Acetilcolina.	28
	6.6.4. Curva Concentración Respuesta a Fenilefrina.	29
	6.6.5. Análisis estadístico.	30
VII.	RESULTADOS.	32
7.1.	Efecto del tratamiento con Cadmio sobre los parámetros electrocardiográficos.	32
7.2.	Efecto del tratamiento con Cadmio sobre la variabilidad de la frecuencia cardíaca.	33
	7.2.1. Dominio del Tiempo.	33
	7.2.2. Dominio de la Frecuencia.	35
7.3.	Efecto del tratamiento con Cadmio sobre la reactividad vascular.	38
	7.3.1. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la respuesta a fenilefrina en anillos arteriales de aorta.	38

7.3.2. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la respuesta a acetilcolina en anillos arteriales de aorta.	39
7.3.3. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la vía de señalización del óxido nítrico en el músculo liso de anillos arteriales de aorta.	41
7.3.4. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre el estrés oxidativo en anillos arteriales de aorta.	42
7.3.5. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la NADPH oxidasa en anillos arteriales de aorta.	44
VIII. DISCUSIÓN.	45
8.1. Mecanismo contracción-relajación dependiente de Óxido Nítrico en el músculo liso vascular.	51
8.2. Mecanismo general de daño a nivel vascular por cadmio.	52
IX. CONCLUSIÓN.	53
X. BIBLIOGRAFÍA.	55
XI. ANEXOS.	60
11.1. Reconocimientos por los resultados obtenidos a partir de esta tesis.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de trabajo.	23
Figura 2.	Registro de Reactividad Vascular.	28
Figura 3.	Análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en dominio del tiempo.	34
Figura 4.	Desviación estándar de los intervalos RR.	34
Figura 5.	Raíz cuadrada de la desviación estándar de los intervalos RR.	35
Figura 6.	Oscilaciones de Baja Frecuencia (LF) del Sistema Nervioso Autónomo.	36
Figura 7.	Oscilaciones de Alta Frecuencia (HF) del Sistema Nervioso Autónomo.	37
Figura 8.	Cociente oscilaciones de Baja Frecuencia sobre oscilaciones de Alta Frecuencia (LF/HF) del Sistema Nervioso Autónomo.	37
Figura 9.	La exposición crónica a Cadmio no modifica la capacidad vasoconstrictora de la aorta de rata.	39
Figura 10.	La exposición crónica a Cadmio disminuye la capacidad vasorelajante de la aorta de rata.	40
Figura 11.	La vía de señalización del Oxido Nítrico no es afectada por la exposición crónica a cadmio.	42
Figura 12.	El efecto del Cadmio en los vasos sanguíneos es revertido por acción de la enzima Superóxido Dismutasa.	43

Figura 13.	El efecto del Cadmio en los vasos sanguíneos es revertido por acción de Apocinina.	45
Figura 14.	Mecanismo de contracción de las células del musculo liso vascular.	51
Figura15.	Mecanismo de acción del Oxido Nítrico.	52
Figura 16.	Mecanismo mediante el cual el cadmio genera disfunción endotelial y daño vascular.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales sistemas dañados en la intoxicación por Cadmio.	8
Tabla 2.	Valores de referencia para el metal pesado cadmio en suelo, agua y alimentos.	10
Tabla 3.	Medición de los intervalos del electrocardiograma.	32

I. INTRODUCCIÓN.

El cadmio (Cd^{2+}) es un metal pesado de característico color blanco-plateado, brillante, dúctil y blando, de estructura cristalina hexagonal, poco soluble en ácidos sulfúrico y clorhídrico. Este metal presenta baja conductividad eléctrica y su punto de fusión es de 321°C ; además al arder genera una llama rojo amarillenta con desprendimiento de humo marrón (óxido de cadmio). El Cd^{2+} es un componente de la corteza terrestre que se encuentra en la naturaleza asociado a Plomo, Cobre, pero principalmente asociado a compuestos de zinc como la esfalerita (ZnS); minerales propios son la blenda de Cd^{2+} (CdS), la otavita (CdCO_3) y la monteponita (CdO). En la actualidad de especial interés el Cd^{2+} ya que es una sustancia tóxica ambiental; se considera que en el agua dulce superficial la presencia de Cd^{2+} está en una concentración de $1\mu\text{g/L}$. En el ambiente se adhiere fuertemente a partículas en la tierra, cierta porción se disuelve en el agua, además de que no se degrada pero puede cambiar de forma. Las plantas y animales pueden incorporarlo a su organismo donde permanece por largo tiempo y puede bioacumularse; también, es incorporado a los cultivos a partir del suelo y el riego acumulándose en los cereales como el arroz y el trigo principalmente, también se encuentra en moluscos y crustáceos y se ha descrito contaminación de alimentos a partir de defectos de la sutura en latas galvanizadas de conserva.

El cadmio, tiene una gran demanda en el mundo, pues se utiliza en la fabricación de pigmentos, pinturas, fungicidas, fertilizantes, en la galvanoplastia y principalmente en la industria de las baterías fabricadas a base de Níquel-

Cadmio. Cada año se liberan aproximadamente a la atmosfera 30 mil toneladas de Cd^{2+} en forma de sales de cadmio; de las cuales aproximadamente el 50% son generadas por la actividad industrial; la actividad volcánica es la mayor fuente natural de eliminación de Cd^{2+} a la atmósfera. En total se considera que el Cd^{2+} representa aproximadamente el 1.5×10^{-5} % en peso de la corteza terrestre. El Cd^{2+} no se degrada en el ambiente, lo que aumenta el riesgo hacia los humanos de estar en contacto con este metal, ya que al ser un contaminante ambiental se ha introducido en la cadena alimenticia.

Todos los humanos somos susceptibles a la ingesta del ion Cd^{2+} principalmente a través de agua y alimentos contaminados y por la inhalación de humo de cigarro. En relación al habito de fumar, se estima que por cada cigarro se está expuesto a $1.7 \mu g$ de Cd^{2+} (Keli *et al*, 2013).

1.1. FARMACOCINÉTICA DEL CADMIO.

1.1.1. Absorción.

El Cd^{2+} alcanza el torrente sanguíneo dependiendo de la vía de ingesta, si esta es oral la absorción será intestinal en menos del 10% siempre que los niveles corporales de Hierro, Calcio y Zinc se encuentren en los rangos normales; por vía respiratoria la absorción será entre un 30 y 50%.

El Cd^{2+} entra al torrente sanguíneo por absorción en el estómago o en los intestinos, luego de la ingesta de comida o agua, o por absorción en los pulmones después de la inhalación.

La absorción de Cd^{2+} en el ámbito intestinal se produce en dos etapas:

1. Las células de la mucosa internalizan el Cd^{2+} presente en el lumen intestinal.
2. Una parte del Cd^{2+} atraviesa la membrana vaso lateral de los enterocitos para pasar a la circulación sanguínea.

De la misma manera la absorción de Cd^{2+} a nivel pulmonar se produce en dos etapas:

1. El Cd^{2+} se localiza en los alveolos pulmonares y por difusión atraviesa hasta alcanzar el torrente sanguíneo.
2. Un gran porcentaje de Cd^{2+} es depositado en todo el tejido pulmonar.

Cuando la dosis oral de Cd^{2+} es elevada, el metal libre atraviesa la mucosa para pasar a la circulación sanguínea, almacenándose en hígado y riñones; en estos órganos se acumula entre el 40 y el 80 % del Cd^{2+} presente en el organismo.

1.1.2. Metabolismo.

El Cd^{2+} es transportado hasta el hígado donde forma complejos con pequeños péptidos y proteínas vía grupos sulfidrilo como pueden ser glutatión (GSH) (Leverrier *et al*, 2007) y metalotioneina (MT) (Coyle *et al*, 2002).

Estudios realizados por el Instituto Nacional de Salud Pública de México, en una población urbana considerada fuera de riesgo arrojaron una concentración media de $0.25 \mu\text{g}$ de Cd^{2+} por dL de saliva donde el límite superior permitido

por este mismo instituto es de 2.04 $\mu\text{g}/\text{dL}$ y el límite inferior es de 0.004 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (González *et al*, 1997).

En administraciones crónicas orales de Cd^{2+} en ratas se estima una concentración plasmática de Cd^{2+} de $40.3 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{L}$ (Almera *et al*, 2013).

En el hígado, pequeñas cantidades del complejo CdMT pasan continuamente del hígado al torrente sanguíneo, donde es transportado a los riñones y filtrado a nivel glomerular, posteriormente es reabsorbido y almacenado en las células tubulares.

El Cd^{2+} es secretado vía biliar y mayoritariamente regresado a circulación en forma de complejos Cadmio-Glutatión (CdGSH), Cadmio-Metalotioneinas (CdMT) o combinación de estos dos complejos, los cuales son tomados por las células de los órganos blanco.

1.1.3. Eliminación.

En condiciones normales, en las que la concentración de Cd^{2+} es pequeña, la mayor parte queda retenida en la mucosa intestinal, principalmente unido a la metalotioneina y es eliminado posteriormente con la descamación de la pared.

En la excreción renal se elimina del 1 al 2 % de Cd^{2+} que ha sido ingerido directamente de las fuentes ambientales, tomando en cuenta que este metal se elimina en muy baja concentración, el riñón es el órgano encargado de eliminar la mayor concentración posible, lo que provoca una acumulación en el tejido renal más alta que en el torrente sanguíneo.

Otro mecanismo que evita la eliminación de este metal a nivel intestinal se debe al proceso de recirculación biliar, el cual transporta nuevamente al Cd^{2+} al hígado, lo cual favorece la disminución de la tasa de eliminación del metal.

1.2. EFECTOS DEL CADMIO EN EL ORGANISMO.

A partir de la mitad del siglo XX, la producción y el uso de Cd^{2+} a nivel industrial se ha expandido rápidamente, y su eliminación se ha convertido en un serio problema para el ambiente. La actividad industrial remueve al Cd^{2+} de sus depósitos naturales insolubles, distribuyéndolo en los diferentes compartimentos ambientales, como aire, tierra y agua, siendo éste el más importante. Esta dinámica ambiental del metal conlleva a la exposición crónica de los organismos, con consecuencias tanto a escala individual y poblacional como consecuencia de los procesos de bioacumulación. El Cd^{2+} que entra en el organismo suele fijarse primeramente a los tejidos, como el riñón, el hígado y los testículos, (Abu-Hayyeh *et al*, 2001) (Prozialeck *et al*, 2006) (Barbara Messner *et al*, 2010), aunque ejerce sus efectos toxicológicos en diversos tejidos mas (tabla 1).

Los efectos tóxicos del Cd^{2+} se manifiestan principalmente en los huesos, pulmones y riñones. El Cd^{2+} , afecta principalmente enzimas e interactúa con grupos SH de las proteínas, generando radicales libres. Entre los daños que produce en estos órganos podemos citar osteomalacia en los huesos y necrosis del epitelio pulmonar.

La toxicidad por Cd^{2+} ocurre cuando una persona aspira niveles elevados de Cd^{2+} en el aire, come alimentos o bebe agua que contienen niveles elevados de Cd^{2+} o a través de consumo por un tiempo prolongado. La exposición al Cd^{2+} , tanto a corto como a largo plazo, puede provocar problemas graves de salud.

Casi todos los alimentos contienen Cd^{2+} , pero puede ser en menor o mayor concentración, sobre todo aquellos que fueron contaminados: carnes (hígado, riñón) y pescados, animales de abasto, crustáceos y moluscos, lácteos y huevos, champiñones, papas y las verduras de hoja. Al ser consumidos de forma esporádica, no existe un alto riesgo para la salud.

El Cd^{2+} es un tóxico sistémico debido al bloqueo de los grupos tiólicos enzimáticos; como ya se mencionó, el órgano blanco por excelencia es el riñón donde afecta al túbulo proximal (Gunnar *et al*, 2009), determinando la aparición de Síndrome de Fanconi (Amino-aciduria, glucosuria, hipercalciuria y fosfaturia). Inhibe la activación de vitamina D favoreciendo los trastornos originados por la insuficiencia renal generada en las intoxicaciones crónicas. La presencia del Cd^{2+} en espacio intracelular puede inducir daño mitocondrial y desencadenar procesos apoptóticos así como necróticos que resultarán en la inflamación y fibrosis de tejidos. Por lo tanto el Cd^{2+} puede causar efectos adversos en diversos órganos como lo son riñones, hígado, pulmones, páncreas, testículos, placenta y huesos, que son los órganos más vulnerables a la intoxicación por Cd^{2+} .

Una característica importante del Cd^{2+} es su capacidad como inductor de estrés oxidativo al estimular la sobreexpresión de la subunidad gp91Phox de la enzima NADPH oxidasa, la cual es una de las principales enzimas generadoras de superóxido (Almenara *et al*, 2013). El estado de estrés oxidativo también se ve favorecido por la disminución de antioxidantes durante la formación de complejos Cd-antioxidantes impidiendo a dichos agentes ejercer su función biológica correcta y dando lugar al incremento de la concentración de radicales libres presentes en el torrente sanguíneo.

Por otra parte, el Cd^{2+} es potencialmente carcinógeno especialmente a nivel de pulmones, próstata y riñones. La International Agency for Research on Cancer coloca al Cd^{2+} en la clasificación 1 de carcinogénicos a pesar de que es débilmente genotóxico. Se conoce que existe una gran relación entre los casos de cáncer de pulmón, vejiga y riñón con la ocupación laboral y/o exposición al Cd^{2+} , así como un aumento de la mortalidad total en poblaciones afectadas (IARC, 1993).

Los efectos tóxicos del Cd^{2+} a nivel celular son diversos; de los cuales una gran cantidad de ellos están relacionados y mediados a las alteraciones en las diversas cascadas de señalización intracelular. Los segundos mensajeros son generados a partir de la activación de un receptor de membrana; estos segundos mensajeros poseen una vida media corta y tienen una función muy específica al momento de realizar su actividad intracelular.

La alteración de la señalización inducida por Cd^{2+} es reflejada por una permanente alteración en la activación del mecanismo de acción, resultando en una baja o elevada concentración y alteración de los segundos mensajeros con la subsecuente pérdida del control del mecanismo de señalización y enzimático. Estas alteraciones de las funciones fisiológicas celulares pueden desencadenar procesos apoptóticos celulares ó inducir una adaptación mediada por estrés que bien puede generar carcinogénesis incrementando las especies reactivas de oxígeno, así como oxidar los grupos tiólicos y generar daños en la transcripción genética (Thévenod *et al*, 2009).

El impacto del Cd^{2+} frente al Ca^{2+} , al AMPc, el NO, las ROS, la MAP cinasa, el FN-kB aún está en proceso de discusión (Thévenod *et al*, 2009).

SISTEMA	DAÑO
Sistema renal y hepático.	Proteinuria, anemia y cálculos renales.
Sistema óseo.	Osteoporosis y dolores reumáticos.
Sistema inmunológico.	Disfunciones de respuesta inmune.
Sistema glandular.	Afecta glándula tiroides.
Sistema cardiovascular.	Hipertensión y enfermedades coronarias
Sistema cutáneo.	Acumulación en uñas y pelo.
Sistema del aparato reproductor.	Daño en los testículos.
Sistema respiratorio.	Enfisema, EPOC, fibrosis, neumonitis química aguda y edema pulmonar.

Tabla 1 Principales sistemas dañados en la intoxicación por Cadmio. La tabla muestra los sistemas mayoritariamente dañados en un proceso de intoxicación por Cd^{2+} a la vez que muestra los daños más evidentes generados por este metal pesado dentro del sistema.

1.3. DOSIS Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN.

La cantidad de metal necesaria para causar un efecto adverso en una persona expuesta depende de: la vía de entrada, el tiempo de exposición, la concentración a la que se está expuesto, las características de la exposición, la forma química y sus propiedades físico químicas. Existen más factores a tener en cuenta que pueden alterar el riesgo de que se presenten enfermedades por exposición al Cd^{2+} , como si se es o no fumador, no usar equipos de protección durante el trabajo industrial, estilo de vida y la edad, entre otros.

Es importante aclarar que la fuente principal de exposición para los bebés y niños en su primera infancia son la leche y productos lácteos, que pueden llevar a que se supere la dosis semanal tolerable provista por la Organización Mundial de la Salud, de la misma manera las instituciones sanitarias de México han tomado valores de referencia para evaluar las concentraciones de metales pesados tanto en suelo como en agua y alimentos y que a sido adoptada por las (Tabla 2).

A)

Concentraciones de Referencia Totales (CR_T) por tipo de uso de suelo		
Contaminante	Uso agrícola/ residencial/ comercial. (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Cadmio	37	450
*Concentraciones máximas para territorios $\geq 1000 \text{ m}^2$		
Concentraciones de Referencia de Contaminantes solubles (CR_s)		
Contaminante		Concentración (mg/L)
Cadmio		0.100
*Dependiendo de la vulnerabilidad del acuífero.		

B)

Para vegetales o sus derivados	
Metal Pesado	Límite Máximo (mg/kg)
Cadmio	0.2
Para productos cárnicos o sus derivados	
Metal Pesado	Límite Máximo (mg/kg)
Cadmio	0.1

Tabla 2. Valores de referencia para el metal pesado cadmio en suelo, agua y alimentos. A) De acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que se refiere a la concentración máxima de cadmio permitida para los suelos y mantos acuíferos. B) De acuerdo a la NOM-130-SSA1-1995: que se refiere a la concentración máxima permitida por la secretaria de salud en vegetales y en productos cárnicos.

1.4. FACTORES DE RIESGO

Cualquier individuo puede padecer toxicidad por Cd^{2+} como resultado de la exposición al metal. Se consideran como factores de riesgo que incrementan la probabilidad de estar expuesto al Cd^{2+} : vivir cerca de basureros o fábricas industriales que emitan Cd^{2+} a la atmósfera, trabajar en una planta de fundición de metales, refinería, en una planta que elabore productos con Cd^{2+} ; la deficiencia nutricional de Calcio, Hierro, Proteínas o Zinc, además del tabaquismo.

1.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INTOXICACIÓN POR CADMIO.

La intoxicación aguda por ingesta de alimentos contaminados con altas dosis de Cd^{2+} se manifiesta por síntomas irritativos a nivel gastrointestinal en la primera hora después del consumo. Se presenta sabor metálico, cólicos violentos, vómitos, diarreas sanguinolentas y toxicidad hepatorenal. La exposición crónica a través de los alimentos o el agua determina un cuadro insidioso de difícil diagnóstico, ya que se presenta: astenia, adelgazamiento, anemia, hipoglobulinemia y proteinuria que progresa al Síndrome de Fanconi, nefrolitiasis, osteomalacia, dolores óseos y fracturas patológicas. (Wiergosz-Kowalewska, 2001) Otras manifestaciones son: fotosensibilidad, disfunción hepática e hipertensión (Pleasant *et al*, 1993), (Wiergosz-Kowalewska, 2001).

De forma común se confirma el diagnóstico de un paciente intoxicado al realizar la determinación de Cd^{2+} en sangre. La presencia de Cd^{2+} en orina tiene únicamente valor orientativo.

1.6. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA INTOXICACIÓN POR CADMIO.

No existe un tratamiento eficaz para la toxicidad por Cd^{2+} , por lo que la prevención es la única opción para reducir la probabilidad de desarrollar toxicidad por Cd^{2+} , por lo que se recomienda no fumar, identificar las posibles fuentes de Cd^{2+} en el hogar y en el trabajo, evitar el uso de fertilizantes con alto nivel de Cd^{2+} , evitar el uso de fungicidas que contengan Cd^{2+} y comer una dieta que proporcione suficiente Calcio, Hierro, Proteínas y Zinc.

El tratamiento habitual ante la presencia de intoxicación severa y aguda consiste en la realización de lavado gástrico (el Carbón Activado no es de utilidad), reposición hidroelectrolítica, y la administración de Vitamina D y Ca^{2+} .

La presencia de Cd^{2+} en el hígado genera lipoperoxidación, lo que se traduce en la presencia de un aumento de Malonaldehído (MDA) que probablemente inhibe la actividad de la enzima barredora de radicales libres Superóxido Dismutasa (SOD) resultando en la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, se ha propuesto que el Magnesio (Mg) es un antagonista competitivo del Cd^{2+} pues la exposición aguda a Cd^{2+} en presencia de Mg aumenta un 50% las concentraciones de Cd^{2+} en plasma, sugiriendo

que el Mg evita que el Cd^{2+} se una a sus sitios blanco; además, esta posible terapia potencia la capacidad antioxidativa de la enzima SOD (Matovic, 2012).

1.7. RUTAS DE EXPOSICIÓN AL CADMIO.

Las principales rutas para exposición al Cd^{2+} son la ingesta y la inhalación.

La ingesta puede ser directamente a través de líquidos, ya sea por consecuencia de las cañerías que contienen Cd^{2+} en sus soldaduras o por el agua que ha sido contaminada por las fábricas que tiran sus desechos al río. Indirectamente, se puede ingerir Cd^{2+} a través de los alimentos, ya que al encontrarse en el suelo puede pasar del agua contaminada a los vegetales y animales, y de estos al hombre; esta cadena es frecuente en áreas mineras, aunque también, cuando se usan fosfatos con alto contenido de Cd^{2+} como fertilizante, debido a la deposición atmosférica y al vertido de lodos contaminados sobre la tierra y el mar; todo esto contribuye a la contaminación de alimentos. Los sistemas acuáticos también son una cadena de bioacumulación a través de los crustáceos y moluscos que ingieren plancton con Cd^{2+} , y lo acumulan en su organismo. La fuente principal para los bebés es la leche materna, ya que las madres con altas concentraciones pueden transmitirlo a través de la misma. Es importante remarcar que se absorbe entre el 6 y el 10 % del Cd^{2+} ingerido.

La contaminación por inhalación es frecuente en trabajadores de industrias que manejan Cd^{2+} , al igual que por respirar el humo de cigarrillo (se duplica la ingesta diaria de Cd^{2+}) y por respirar el aire contaminado cerca de donde se queman combustibles fósiles o desechos inorgánicos. Referente a esta vía de entrada, datos de estudios analizados de una exposición crónica con animales indica una alta absorción de Cd^{2+} ; de acuerdo con diferentes autores se absorbe en rangos de $7 \pm 40\%$ a $20 \pm 30\%$ (Friberg *et al*, 1986), (Goyer, 1991). La velocidad de absorción depende del Cd^{2+} principalmente en su concentración en el aire y en el tamaño de las partículas inhaladas, dependiendo de la estructura con la que se encuentre ligado y de la estructura química de los compuestos metálicos (Wiergosz-Kowalewska, 2001).

2. ANTECEDENTES.

En la literatura especializada, se encuentran múltiples evidencias que apoyan la propuesta de que el Cd^{2+} aumenta el estrés oxidativo y a través de este mecanismo genera la mayoría de los efectos sistémicos reportados. En particular a nivel cardiovascular, este hecho es relevante ya que es ampliamente aceptado que el incremento de estrés oxidativo, da lugar a la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico de origen endotelial, lo cual conduce a un incremento de tono vascular y la consecuente disminución del flujo sanguíneo hacia un determinado tejido; este hecho podría explicar en parte la aparición de hipertensión arterial y las perturbaciones en la conducción cardíaca en la presencia de altas concentraciones de calcio en el organismo.

Se ha reportado, que el Cd^{2+} genera un incremento en la reactividad vascular a fenilefrina, según Keli *et al*, 2013, debido a la presencia de radicales libres derivados de la NADPH oxidasa que podría estar siendo estimulada a su vez por el sistema Renina-Angiotensina local mediante vasoconstrictores prostanóicos derivados de la vía de activación de la ciclooxigenasa 2 (COX2); esto generará un incremento en la resistencia periférica pudiendo generar hipertensión. Almera *et al*, 2013, refuerza la teoría de que el Cd^{2+} genera aumento en la capacidad contráctil de los vasos sanguíneos al decir que el Cd^{2+} estimula la sensibilidad de los receptores α_1 -adrenergicos; observó la sobreexpresión de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), lo que relacionó con la presencia de radicales libres, por lo que propone que existe una posible disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico por acción de los radicales superóxido; señal necesaria para aumentar la fabricación de NO a partir del aminoácido L-Arginina mediante la eNOS; además encontró una sobreexpresión de la proteína gp91phox subunidad de la NADPH oxidasa principal generadora de especies reactivas de oxígeno en el organismo humano. Los animales tratados con Cd^{2+} presentan un aumento de la glucosa plasmática debida a una disminución de la secreción de insulina, y un aumento de los niveles de MDA causado por un incremento de la lipoperoxidación como consecuencia de la presencia de radicales libres (Chang *et al*, 2013).

Existe una gran controversia en si el Cd^{2+} genera un aumento o disminución de la expresión de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). Liu and Templeton, 2007 demostraron que el Cd^{2+} a concentraciones bajas incrementa la fosforilación y la activación del complejo Calcio-Calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)

dependiente de la proteína cinasa II (CaMK-II), que es un paso indispensable en la ruta de señalización del Calcio (Ca^{2+}) para generar la contracción del músculo liso vascular; en contraste otros autores afirman que el Cd^{2+} induce la activación de la MLCK (Kostrzewska and Sobieszek, 1990; Chao *et al*, 1995), mecanismo por el cual se podría reforzar la idea de que el Cd^{2+} genera hiperreactividad vascular.

Otra manera de que el Cd^{2+} cause daño a nivel celular es mediante la unión a receptores de la superficie celular generadores de segundos mensajeros, afectando la vía de señalización del Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc) de manera que podría generar el mal funcionamiento celular por una alteración de las actividades metabólicas enzimáticas, hormonales, de transporte de iones y disminuyendo los genes de proliferación (Skalhegg and Tasken, 2000). Sin embargo estudios como los de Merali *et al*, 1975; Ando *et al*, 1989; Dailianis and Kaloyianni, 2007, demuestran una mayor concentración de AMPc dependiente del aumento en la expresión de la enzima Adenilato Ciclasa (AC) y una disminución en la actividad de la Fosfodiesterasa (PDE) en hepatocitos de ratas con una exposición crónica a Cd^{2+} ; aunque se han registrado altas concentraciones de AMPc en orina en estos mismos sujetos (Ando *et al*, 1989), indicando que se está excretando este segundo mensajero sin realizar su función biológica.

3. JUSTIFICACIÓN.

En Toyama, Japón, la ingesta de arroz que fue regado con agua contaminada con Cd^{2+} , esto produjo una entrada al cuerpo de unos 300 μg diarios de ese metal. El Cd^{2+} provenía de una explotación minera de las cercanías. La enfermedad se la conoce como Itai Itai (ay ay) por los dolorosos síntomas de las fracturas múltiples producidas por osteomalacia.

En la década de 1940, durante la fabricación de baterías alcalinas de níquel-cadmio, varias personas murieron en Suecia por la acción del óxido de Cd^{2+} , cuya concentración en el aire era de algunos mg/m^3 .

En Shipham, una población cercana a una mina de zinc en Inglaterra, se observó que los habitantes tenían signos de toxicidad por Cd^{2+} , presentando en el hígado unos niveles de metal cinco veces superior a los encontrados en habitantes de áreas no contaminadas. Las verduras cultivadas en el área contenían más de 7 mg/kg de peso seco, concentración muy superior al contenido de Cd^{2+} encontrado en la intoxicación de Japón.

En Suecia, hubo una intoxicación oral aguda en una escuela, donde los niños consumieron un zumo de fruta procedente de una máquina expendedora en la que el depósito estaba enchapado con Cd^{2+} .

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. La hipertensión y la hipercolesterolemia son factores de riesgo para complicaciones cardiovasculares ampliamente estudiados; sin embargo, de acuerdo a diversas evidencias clínicas y experimentales, la intoxicación por Cd^{2+} es considerada como un factor de riesgo emergente. Se ha reportado que la exposición a Cd^{2+} induce diversos cambios en el sistema cardiovascular como son daño estructural del miocardio, aumento del volumen sistólico, del gasto cardiaco y de la presión arterial asociados al incremento del estrés oxidativo. El Cd^{2+} no afecta la frecuencia cardiaca pero si desvía el eje T del ECG, un predictor de arritmias ventriculares. Los efectos del cadmio sobre el corazón pueden ser divididos en 2 fenómenos; a) efectos sobre la estructura e integridad del tejido; y b) efectos sobre el sistema de conducción cardiaco. El primero es reflejado por daños severos al musculo cardiaco, por ejemplo necrosis y cambios ultra estructurales dentro de las células. La fisiopatología de estos fenómenos no ha sido bien establecida pero a partir de diversos estudios publicados se han sugerido varias hipótesis para explicar los efectos del Cd^{2+} a nivel cardiaco; entre estas, se pueden mencionar el daño a nivel cardiovascular por una alteración de la defensa antioxidante generando el incremento de especies reactivas de oxígeno lo que provocará una inhibición de la cadena transportadora de electrones en el cardiomiocito y una marcada reducción en el flujo coronario.

Los efectos del Cd^{2+} sobre la conducción cardiaca son basados en las interacciones de Cd^{2+} con el sistema marcapasos y la contracción. Los fenómenos observados incluyen bloqueo de la corriente de potasio y de la

corriente de calcio tipo L ambos en miocitos ventriculares, una interacción del cadmio con los procesos mediados por el calcio en el corazón y bloqueo de las corriente de sodio de fibras de purkinje.

Recientemente se ha involucrado al endotelio vascular como órgano diana en las complicaciones de la toxicidad por Cd^{2+} probablemente por la presencia de las especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, la disfunción endotelial es trascendental en las complicaciones cardiovasculares de enfermedades como la diabetes mellitus donde el daño al endotelio se atribuye al incremento del estrés oxidativo por sobreexpresión de la NADPH oxidasa. Sin embargo, se desconoce el papel de la NADPH oxidasa sobre el daño endotelial en sujetos con exposición al Cd^{2+} , aunque ya se sabe que este induce un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes además de un daño en diferentes vías de señalización (Ambilily *et al*, 2013).

4. HIPOTESIS.

La exposición a cadmio aumenta el estrés oxidativo y reduce la biodisponibilidad de óxido nítrico de origen endotelial, reduciendo la respuesta relajante estimulada por acetilcolina y dependiente de óxido nítrico en aorta de rata.

5. OBJETIVOS.

5.1. General

Evaluar los cambios en el sistema cardiovascular de ratas inducidos por la exposición crónica a Cd^{2+} .

5.2. Particulares

Evaluar el efecto de la exposición crónica a Cd^{2+} sobre la relajación de la aorta dependiente de NO.

Evaluar el efecto de exposición crónica a Cd^{2+} sobre los parámetros electrocardiográficos.

6. METODOLOGÍA.

6.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de entre 2 y 3 meses de edad, con un peso entre 200 y 250 gramos; que fueron proporcionadas por el bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron distribuidos en forma aleatoria en un grupo Control (Control) y en un grupo experimental (Cd^{2+}), ambos grupos con una $n=8$. En el grupo experimental se administró cloruro de cadmio (CdCl_2) en una disolución acuosa *ad libitum* vía oral con una concentración de 2 mg/kg durante un periodo de 8 semanas por medio del bebedero. Al grupo Control solamente le fue suministrada agua en el bebedero. La administración de Cadmio se inició una vez que las ratas alcanzaron el peso de 75 g. Ambos grupos de animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se sacrificaron al término de las 8 semanas de tratamiento para realizar los protocolos experimentales consecuentes. 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.

Previo a la toma del registro electrocardiográfico, los animales fueron anestesiados con ketamina-xilacina (60mg/kg – 4mg/kg respectivamente). En su caso el sacrificio del modelo experimental se realizó a través de una sobredosis de la misma mezcla de anestésicos.

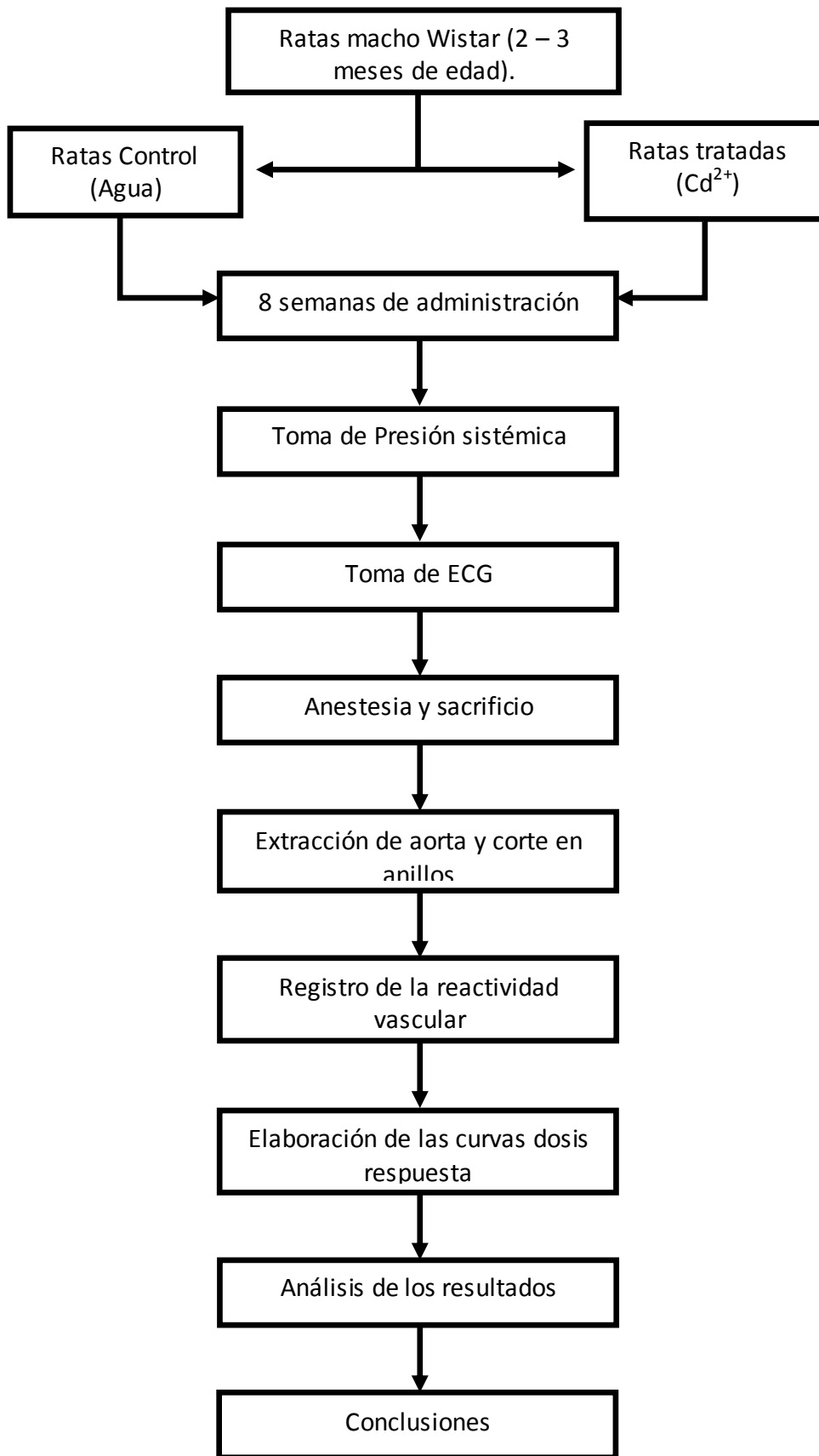


Figura 1. Diagrama de trabajo. Diagrama de trabajo que se utilizó en la elaboración de esta tesis.

6.2. Registro de electrocardiograma (ECG).

Previo al registro electrocardiográfico, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (60mg/Kg) y Xilacina (7mg/Kg). Posteriormente se trasquilaron desde la región torácica hasta la región epigástrica para la colocación de electrodos. Se obtuvo el registro de la derivación II del plano frontal (electrodo negativo en la extremidad derecha delantera y el electrodo positivo en la extremidad izquierda trasera). La señal eléctrica emitida fue amplificada (BIO Amp CF, ADInstruments), y posteriormente digitalizada por el equipo Powerlab 4/35 (ADInstruments), la cual fue transmitida al software LabChart 7 (ADInstruments) donde fue capturado el ECG para análisis posterior.

El registro fue efectuado previo al inicio de la administración de cadmio y al final del periodo de exposición (8 semanas) En cada caso, el registro contó con una duración mínima de 5 minutos.

6.3. Obtención de los parámetros electrocardiográficos.

Los parámetros electrocardiográficos a cuantificar fueron los siguientes: intervalo PR, intervalo QRS, intervalo QT e intervalo RR; para el intervalo PR se midió desde el inicio de la onda P al comienzo de la onda R; para el intervalo QRS se cuantificó tomando el principio de la onda Q hasta el final de la onda S; para el intervalo QT se tomó desde el inicio de la onda Q hasta el final de la onda T; y para el intervalo RR se midió el tiempo transcurrido de un

pico R al pico R sucesivo. Los datos fueron analizados con el software LabChart 7 (ADInstruments) y fueron expresados en milisegundos.

Para cada caso, se consideró como valor real la media de 3 mediciones que se obtuvieron a partir de 3 ciclos cardiacos consecutivos. Además se calculó la frecuencia cardiaca (latidos/minuto) utilizando el valor promedio de los intervalos RR.

6.4. Análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca.

El análisis de la VFC fue realizado en el dominio del tiempo y en el dominio de la frecuencia. Para este fin se capturaron 15 minutos de cada ECG y después se procedió a su análisis utilizando el software Kubios HRV 2.1 (University of Eastern Finland). Previo al análisis se eliminaron los intervalos RR anormales (artefactos) que no correspondieran con el ECG basal.

Para el análisis en el dominio del tiempo se consideró la desviación estándar de los intervalos RR (SDRR) que refleja todos los componentes de la variabilidad respecto al tiempo (la VFC total) y la raíz cuadrada de la media de las diferencias al cuadrado de los intervalos RR adyacentes (RMSSD), la cual estima las variaciones latido a latido de la actividad vagal regulatoria.

Para el análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia, se cuantificaron los componentes de muy baja frecuencia (VLF), baja frecuencia (LF) y alta frecuencia (HF), con la finalidad de obtener los rangos de frecuencias; para

cada elemento se consideraron los empleados por Aubert *et al*, en 1999 que en el ECG de rata van de 0.0-0.18Hz, 0.19-0.74Hz y 0.75-2.5Hz respectivamente. El parámetro LF es un indicador que la suma de las influencias del SNS y SNP; por otra parte, el parámetro HF es un indicador de la regulación del SNP. Por último se obtuvo el cociente LF/HF a partir de los valores expresados en porcentaje y en Unidades Normalizadas (UN), como un indicador del balance simpático - vagal.

6.5. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media. El contraste entre los dos grupos fue realizado mediante una prueba *t* de Student para datos no pareados y valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados como diferencia estadísticamente significativa.

6.6. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.

6.6.1. Obtención de tejidos.

Después de sacrificar a los animales, se aisló la sección torácica de la aorta y se dividió en anillos de 3 mm de longitud, se le retiró con ayuda de una fina tijera y de manera muy cuidadosa el tejido conectivo presente en el vaso.

Los anillos arteriales fueron montados en cámaras de doble pared (copas de Ahlin) termostalizadas a 37°C, con 5 ml de solución de Krebs-Henseleit, burbujeada con una mezcla carbógena (95% O₂ y 5% CO₂).

La solución Krebs-Henseleit tuvo la siguiente composición: NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM y glucosa 11 mM.

6.6.2. Registro de contractilidad.

En la cámara de Ahlin, los anillos se situaron entre dos alambres de acero inoxidable con forma de L (0.2 mm de diámetro), uno de los cuales se fijó a la copa y el otro a un transductor isométrico (ADInstruments), acoplado al Powerlab 25/8. La señal obtenida se envió a un convertidor análogo-digital (Powerlab), esta señal que indica la fuerza contráctil digitalizada se almacenó en una computadora empleando el software (LabChart 7.0). A los anillos se les aplicó una tensión basal isométrica de 2 g. En estas condiciones, las preparaciones se dejaron estabilizar durante un periodo de 30 minutos antes de realizar cualquier protocolo experimental.

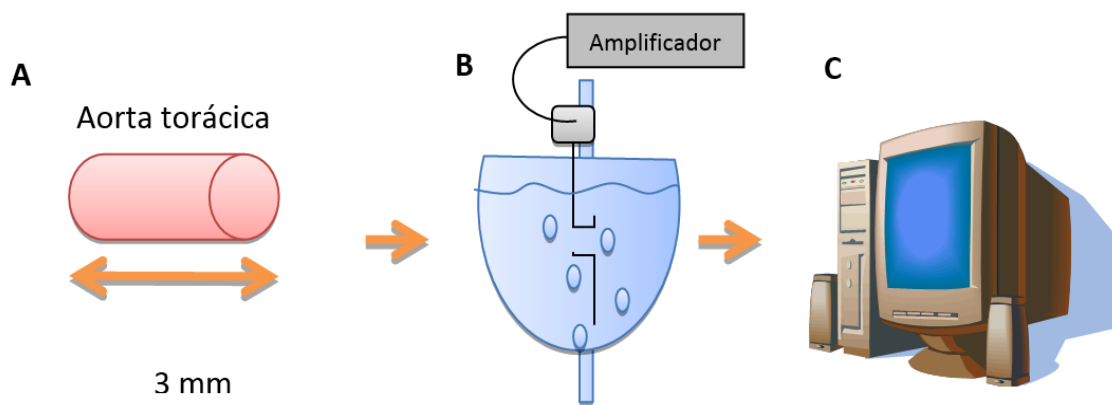


Figura 2. Registro de Reactividad Vascular: **A.** Muestra un segmento de tres milímetros de longitud de la Aorta de rata que se monta entre los alambres en forma de L. **B.** Muestra la copa de Allhin con solución Krebs-Henseleit siendo burbujeada con gas carbógeno en la parte superior se observa el transductor de tensión conectado a un amplificador de señal. **C.** Equipo de cómputo con el cual se registra la señal digitalizada con el programa LabChart 7.0 para su posterior análisis.

Para evaluar la respuesta contráctil y relajante de los vasos sanguíneos obtenidos de ambos grupos experimentales, después del periodo de estabilización se realizaron curvas dosis respuesta tanto a fenilefrina (agonista adrenérgico) como a acetilcolina.

6.6.3. Curvas concentración respuesta a Acetilcolina.

Se realizaron curvas concentración-respuesta acumulativa a Acetilcolina (Ach) en ambos grupos de estudio. Los protocolos fueron de la siguiente manera: después del periodo de estabilización de los anillos arteriales en las copas de Allhin, las preparaciones fueron pre-contraídas colocando en la cámara una concentración de fenilefrina de 1×10^{-7} M y cuando se alcanzó el estado estacionario se administraron concentraciones acumulativas de Ach a la cámara desde la concentración de 1×10^{-9} M hasta 3×10^{-5} M. Estos protocolos fueron hechos en preparaciones con el endotelio intacto.

6.6.4. Curvas concentración respuesta a fenilefrina.

Para estos protocolos, el endotelio fue removido de las preparaciones de forma mecánica, rotando un alambre a través de la luz del vaso para retirar la monocapa endotelial.

Los protocolos fueron de la siguiente manera: después del periodo de estabilización de los anillos arteriales, se añadió a la cámara una concentración de cloruro de potasio (KCl) de 80 mM con la finalidad de conocer la contracción máxima desarrollada por la arteria, una vez que se alcanzó la tensión máxima se cambió en tres ocasiones la solución de la copa con la finalidad de remover el KCl presente. Posteriormente a los tres lavados y una vez que las preparaciones alcanzaron su valor basal de tensión se administraron concentraciones acumulativas de fenilefrina desde 1×10^{-9} M hasta 1×10^{-4} M a la cámara.

Para evaluar la participación de la biodisponibilidad del NO en la función endotelial de la aorta de rata de ambos grupos se realizaron los siguientes protocolos experimentales:

Con la finalidad de evaluar la actividad de las especies reactivas de oxígeno en la capacidad relajante de las arterias de ambos grupos las preparaciones fueron contraídas con una dosis de fenilefrina de 1×10^{-7} M, después de alcanzar un periodo estable de tensión ejercida con este agonista adrenérgico se agregó una concentración de 100 U/mL de la enzima SOD (barredor del

anión superóxido), transcurridos 20 minutos y tras un periodo de estabilización se realizaron CDR acumulativas a Acetilcolina (1×10^{-9} M - 1×10^{-4} M).

Con la finalidad de evaluar la actividad de la enzima NADPH oxidasa en la capacidad relajante de las arterias de ambos grupos las preparaciones fueron contraídas con una dosis de fenilefrina de 1×10^{-7} M, después de alcanzar un periodo estable de tensión se agregó una concentración de 3×10^{-4} M de Apocinina (Inhibidor de la NADPH oxidasa), transcurridos 20 minutos y tras un periodo de estabilización se realizaron CDR acumulativas a Acetilcolina (1×10^{-9} M - 1×10^{-4} M).

Para evaluar el estado de la vía de señalización del NO en la capa de musculo liso aórtico se utilizó la estrategia farmacológica de introducir NO de manera exógena mediante la administración de Nitroprusiato de sodio (NPS), un donador de NO, en ambos grupos.

Después del periodo de estabilización se indujo la respuesta contráctil a fenilefrina con una dosis de 1×10^{-7} M. Después de alcanzar el estado estacionario se realizaron la CDR acumulativas a NPS desde las concentraciones de 1×10^{-9} hasta 1×10^{-4} M.

6.6.5. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media para un determinado número de anillos arteriales (n) de distintos

animales. Las curvas concentración-respuesta para acetilcolina y para fenilefrina se ajustó mediante el programa de análisis de datos Origin 8.5 con la siguiente ecuación logística.

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

Donde:

E es el efecto del fármaco.

E_{max} 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 E_{max}.

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 utilizó el paquete informático Origin 8.5. Los resultados experimentales y controles se contrastaron con una prueba de *t* de Student para datos no apareados. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que $p < 0.05$.

7. RESULTADOS.

El peso de los animales de ambos grupos experimentales no mostró diferencia significativa ni al inicio ni al final del periodo de tratamiento.

7.1. Efecto del tratamiento con Cadmio sobre los parámetros electrocardiográficos.

A partir del análisis de los diferentes intervalos del electrocardiograma se obtuvo que en el modelo empleado, el tratamiento crónico con cadmio no modificó de forma significativa ninguno de los parámetros registrados; los valores de los mismos se muestran en la tabla 3.

	Grupo Control		Grupo Cadmio		Grupo Control		Grupo Cadmio		Grupo Control		Grupo Cadmio	
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
5 min ECG	Semana 0		Semana 0		Semana 4		Semana 4		Semana 8		Semana 8	
Intervalo PR (ms)	62	±1	62	±1	59.7	±3,1	55.4	±2,5	53.1	±2,7	50.9	±2,4
Intervalo QRS (ms)	22	±1	22	±1	18.6	±0,8	19.6	±0,4	17.9	±0,5	19.7	±0,3
Intervalo QT (ms)	94	±3	94	±3	96.2	±3,9	97.6	±4,7	96.6	±2,5	98.7	±4,2
Intervalo RR (ms)	4.016		4.016		3.833		4.116		3.85		4.000	
FC (latidos/min)	241	±16	241	±16	230	±13	247	±20	231	±5	240	±8

Tabla 3. Medición de los intervalos del electrocardiograma. La tabla muestra los datos electrocardiográficos de un periodo de cinco minutos tanto de sujetos del grupo control como del grupo tratado con cadmio. Observamos los datos a las 0, 4 y 8 semanas del tratamiento.

7.2. Efecto del tratamiento con Cadmio sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca.

7.2.1. Dominio del Tiempo.

La exposición crónica a Cd^{2+} indujo una disminución significativa en la dispersión de los intervalos RR como se observa en el tacograma de la figura 3. Este hallazgo gráfico indica una disminución de la VFC en el grupo tratado con cadmio (que justamente es una variación en la duración de los intervalos RR). Por esta razón, se procedió a realizar el análisis de la VFC en el dominio del tiempo y en el dominio de la frecuencia.

En el primer caso, el grupo tratado con cadmio a las 8 semanas presentó una disminución significativa en el valor de SDNN ($p < 0.05$) al compararse con el grupo control (13.8 ± 2.7 ms vs 6.7 ± 1.3 ms, respectivamente, Figura 4).

Resultados similares fueron obtenidos con el índice RMSSD, el cual ha sido asociado a la modulación de la FC por el SNP. El grupo tratado con Cd^{2+} , presentó una disminución significativa en el valor de RMSSD ($p < 0.05$) al compararse con el grupo control (5.8 ± 0.8 ms vs 17.2 ± 4.5 ms, respectivamente, Figura 5).

La reducción de ambos parámetros indica que la exposición crónica a cadmio, incide en la modulación parasimpática sobre la función cardíaca.

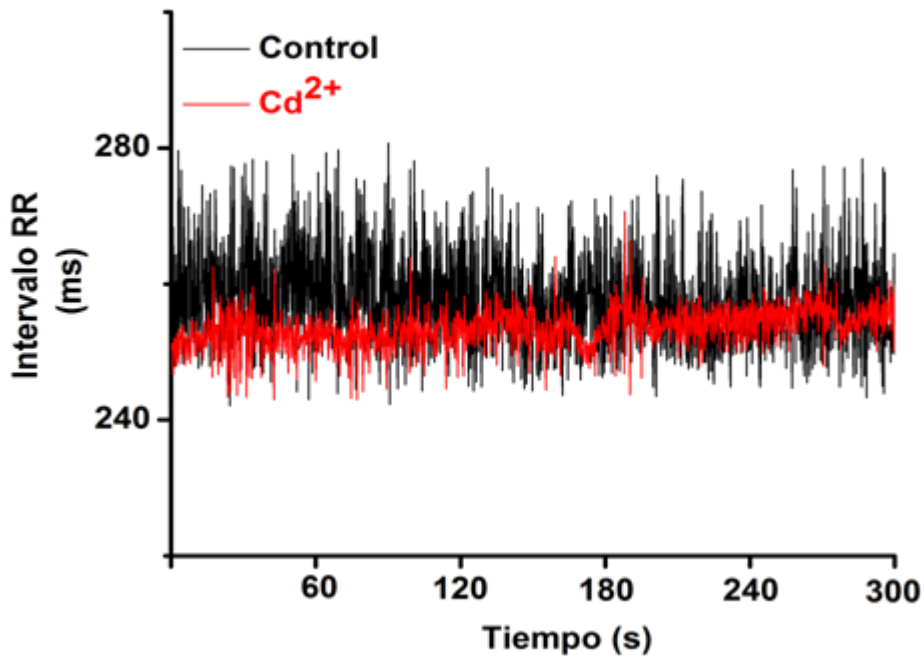


Fig.3 Análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en dominio del tiempo. El tacograma muestra los intervalos de los segmentos RR de ratas control y ratas tratadas con cadmio.

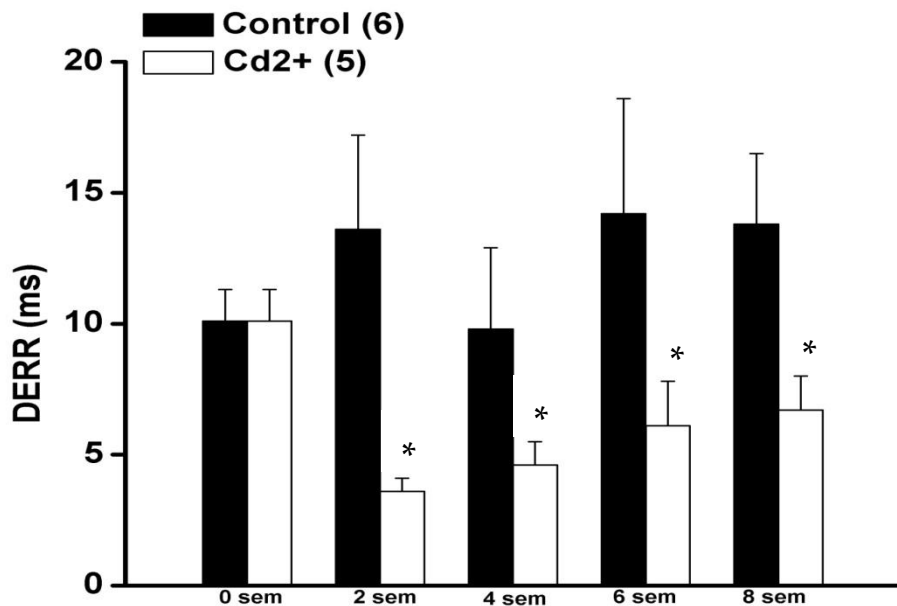


Figura 4. Desviación estándar de los intervalos RR (SDNN ó DERR). Se observa en las gráficas de barra que al inicio del tratamiento ambos grupos tienen la misma desviación estándar; a medida que aumenta el tiempo de exposición al cadmio empieza a notarse un cambio significativo del grupo experimental respecto al grupo control. *p<0.05.

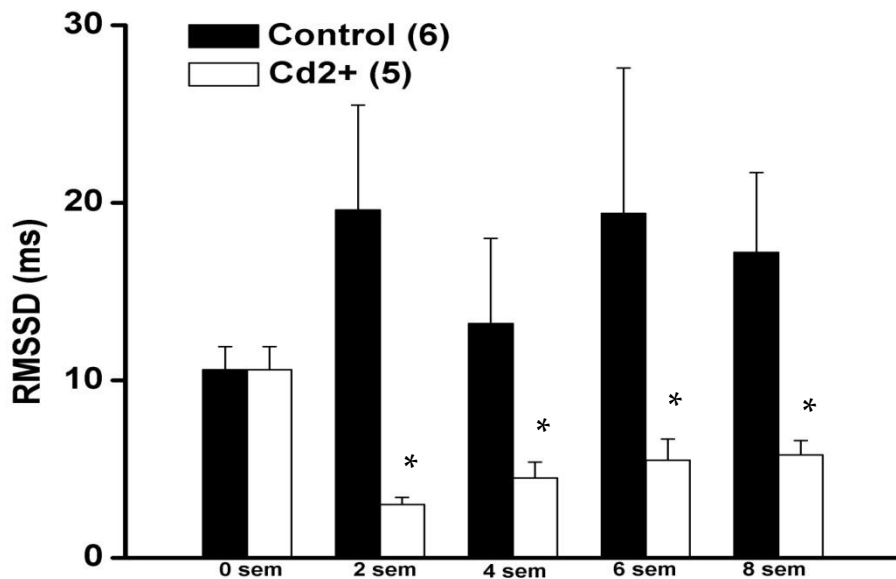


Figura 5. Raíz cuadrada de la desviación estándar de los intervalos RR (RMSSD). Se observa en las gráficas de barra que al inicio del tratamiento ambos grupos tienen la misma RMSSD; a medida que aumenta el tiempo de exposición al cadmio empieza a notarse un cambio significativo del grupo experimental respecto al grupo control. * $p < 0.05$.

7.2.2. Dominio de la Frecuencia.

Los resultados en el dominio de la frecuencia apuntan en el mismo sentido que los obtenidos en el dominio del tiempo, ya que se observó una disminución de la VFC en el grupo tratado con Cd^{2+} . La exposición crónica a Cd^{2+} , modificó significativamente las oscilaciones de baja frecuencia, asociada a la actividad del SNS sobre la FC. Para el caso de las oscilaciones de alta frecuencia se observó una disminución significativa.

El grupo tratado con Cd^{2+} , presentó un incremento significativo en el valor del componente LF al compararse con el grupo control (38.6 ± 11.1 ms vs 21.6 ± 1.7 , respectivamente, Figura 6).

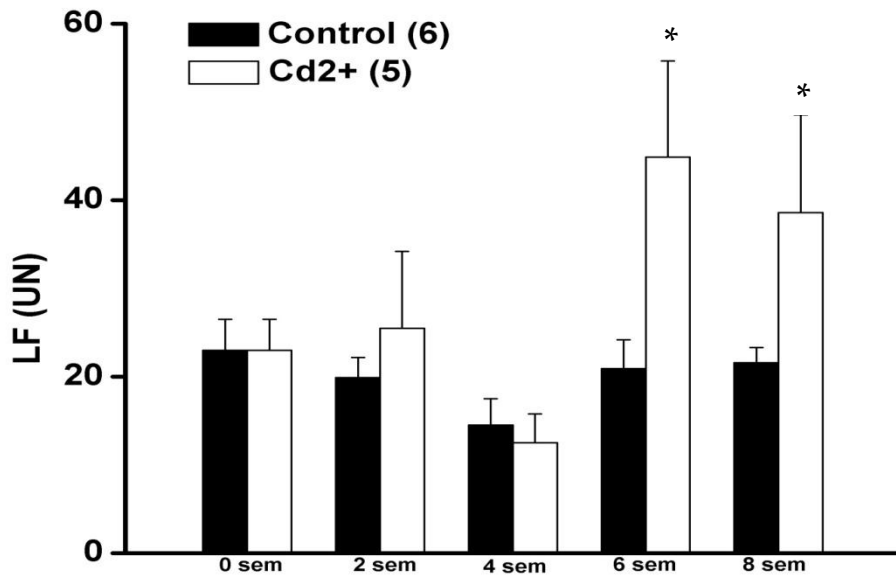


Figura 6. Oscilaciones de Baja Frecuencia (LF) del Sistema Nervioso Autónomo. Se observa en las gráficas de barra que al inicio del tratamiento ambos grupos tienen la misma frecuencia de oscilaciones; nótese que a partir de la sexta semana ya se observa un cambio significativo del grupo experimental respecto al grupo control. * $p < 0.05$.

En el caso del componente HF, los valores obtenidos fueron 75.7 ± 2.3 ms vs 58.1 ± 11.4 ms, para el grupo control y tratado respectivamente, Figura 7.

Finalmente, como consecuencia del aumento de las oscilaciones de baja frecuencia y la disminución de las oscilaciones de alta frecuencia en el grupo tratado, el cociente LF/HF presentó un incremento significativo durante la exposición crónica a cadmio al compararse con el grupo control (0.29 ± 0.03 ms vs 1.1 ± 0.4 ms, figura 8). Este cociente es considerado como un indicador del balance simpático-vagal sobre la función cardíaca.

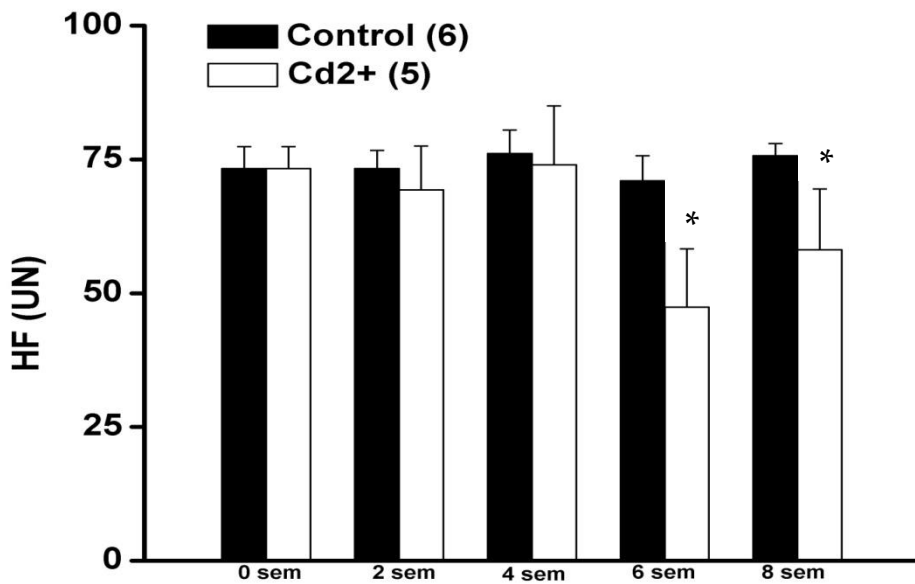


Figura 7. Oscilaciones de Alta Frecuencia (HF) del Sistema Nervioso Autónomo. Se observa en las gráficas que al inicio del tratamiento ambos grupos tienen la misma frecuencia de oscilaciones; nótese que a partir de la sexta semana ya se observa un cambio significativo del grupo experimental respecto al grupo control. * $p \leq 0.05$.

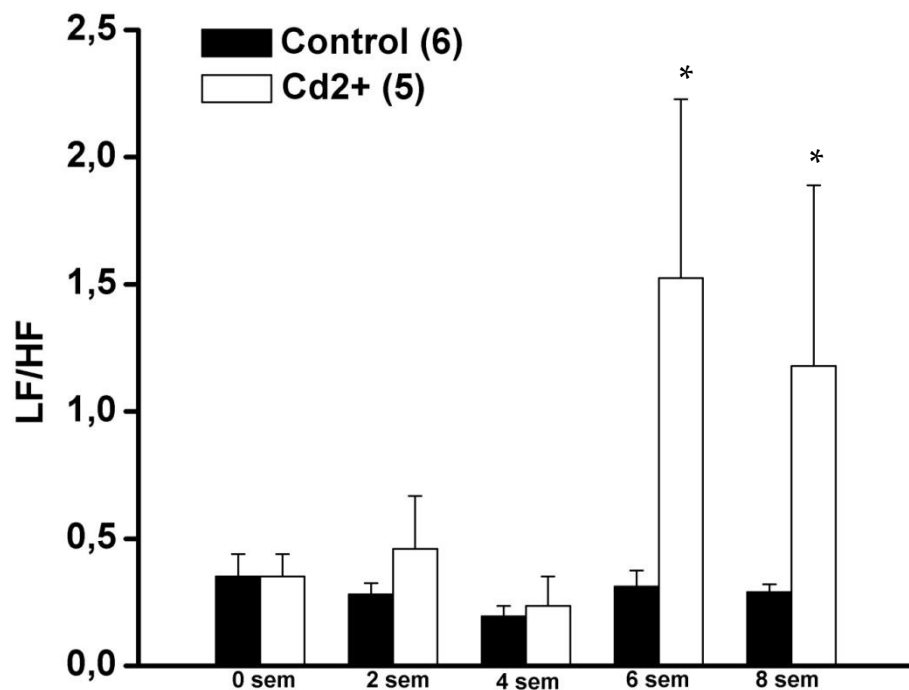


Figura 8. Cociente oscilaciones de Baja Frecuencia sobre oscilaciones de Alta Frecuencia (LF/HF) del Sistema Nervioso Autónomo. Se observa una clara alteración del balance de las oscilaciones en la semana seis y ocho respecto a la semana cero; este cociente resulta evidente al observar las alteraciones observadas en las figuras 6 y 7. * $p < 0.05$.

7.3. Efecto del tratamiento con Cadmio sobre la reactividad vascular.

El efecto contráctil inducido por el KCl 80 mM en los anillos del grupo control fue semejante al presentado por los anillos del grupo de animales con tratamiento de Cd²⁺ (2.4 ± 0.3 y 2.0 ± 0.3 g, respectivamente).

7.3.1. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la respuesta a fenilefrina en anillos arteriales de aorta.

La noradrenalina participa en la modulación del tono vascular mediante la unión a receptores α_1 adrenérgicos de la membrana plasmática de las células del músculo liso vascular. Por lo que esta tesis empleamos fenilefrina, un análogo de la noradrenalina para evaluar la respuesta contráctil de la aorta en nuestro modelo de exposición crónica a cadmio.

Durante la realización de curvas concentración-respuesta a fenilefrina se obtuvo que la respuesta contráctil arterial es dependiente de la concentración. Los anillos aislados de los 2 grupos analizados mostraron una respuesta similar a fenilefrina. Como se observa en la figura 9 (panel A), las curvas concentración respuesta a fenilefrina se sobre impusieron en todo el rango de concentraciones empleadas (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M) y el efecto máximo de la respuesta contráctil (E_{max}) se alcanzó en 3×10^{-5} M en ambos grupos. El efecto máximo para el grupo con Cd²⁺ fue de $136 \pm 0.03\%$ mientras en el grupo control fue de $140 \pm 0.05\%$; de la misma forma, no se obtuvo cambio significativo en el valor del pD₂ entre los grupos, los valores obtenidos fueron 7.2 ± 0.01 % vs

7.6±0.02 % para los grupos con Cd²⁺ y control respectivamente. Estos resultados indican que no se modifica ni la sensibilidad ni el número de receptores α1-adrenérgicos encargados de generar la respuesta contráctil en musculo liso de los vasos sanguíneos.

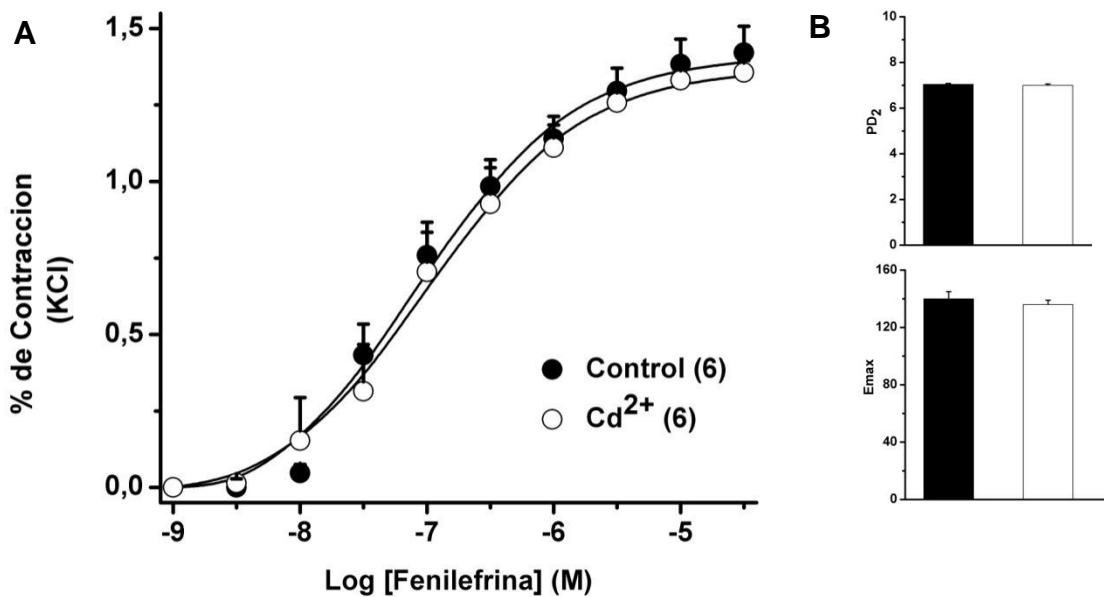


Figura 9. La exposición crónica a Cadmio no modifica la capacidad vasoconstrictora de la aorta de rata. A Se observan las curvas concentración-respuesta acumulativa a fenilefrina. La tensión desarrollada en la aorta en repuesta a fenilefrina de ratas con cadmio fue similar a la desarrollada en preparaciones del grupo control. **B** se observa que no hay un cambio significativo en el efecto máximo (E_{max}) ni en el pD₂ generado por fenilefrina en el grupo tratado con cadmio. En las curvas y en las barras los resultados se presentan como la media ±EEM.

7.3.2. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la respuesta a acetilcolina en anillos arteriales de aorta.

En anillos pre contraídos con fenilefrina 1x10⁻⁶ M, se realizaron curvas concentración-respuesta a acetilcolina observándose una respuesta relajante dependiente de la concentración. Esta respuesta considerada como un

indicador de la función endotelial fue disminuida de forma significativa en los anillos aórticos del grupo con cadmio en relación a datos obtenidos en el grupo control (Fig. 10), es decir, la administración crónica de cadmio induce la aparición de disfunción endotelial. El Emax de la respuesta relajante en el grupo control fue de $77.1 \pm 3\%$ mientras que en el grupo con cadmio el Emax obtenido fue de $62.7 \pm 3\%$, $p < 0.05$. Por otra parte, No se obtuvo cambio significativo en los valores del pD_2 entre los grupos analizados, como se observa en la figura x (panel B) los valores obtenidos fueron $7.0 \pm 0.07\%$ vs $6.6 \pm 0.06\%$ en los grupos con Cd^{2+} y control respectivamente. Este último dato indica que la concentración de acetilcolina necesaria para generar el 50% de la respuesta relajante no sufre cambio durante la administración crónica de cadmio.

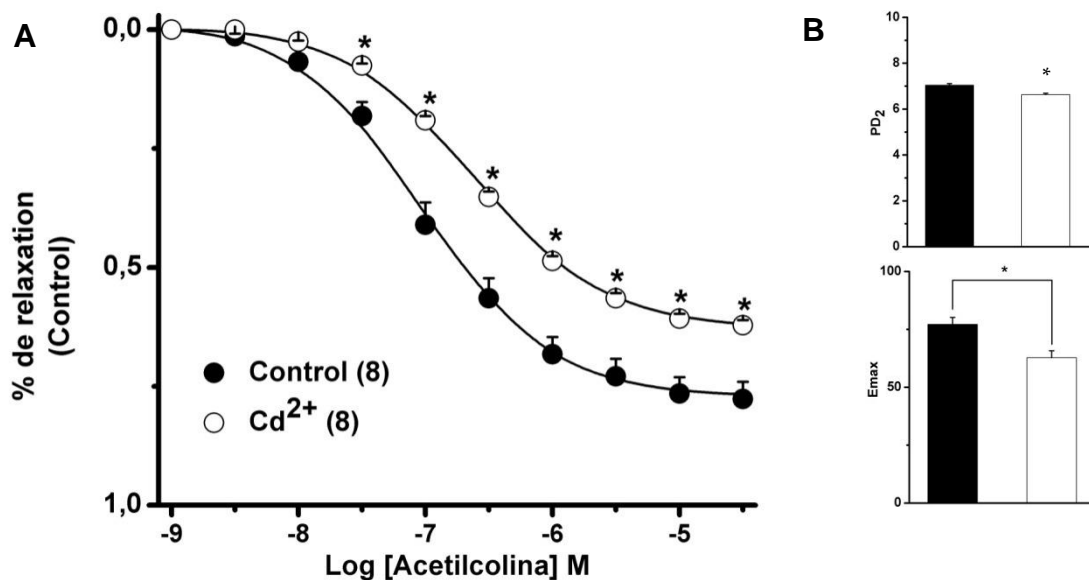


Figura 10 La exposición crónica a Cadmio disminuye la capacidad vasorelajante de la aorta de rata. A Se observa la disminución de la respuesta relajante a acetilcolina en el grupo tratado con cadmio respecto a los anillos provenientes del grupo de ratas control. **B** se observa un cambio significativo en el efecto máximo (Emax) y en el pD_2 generado por acetilcolina en el grupo tratado con cadmio. En las curvas y en las barras los resultados se presentan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$.

7.3.3. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la vía de señalización del óxido nítrico en el musculo liso de anillos arteriales de aorta.

Los anillos aórticos provenientes de las animales del grupo con cadmio presentan disfunción endotelial; entonces es posible que este efecto ocurra a partir de un daño en la vía de señalización del NO a nivel de la capa media de la aorta. En esta sección de resultados se analizó la respuesta de las preparaciones experimentales ante NPS, el cual alcanza a la capa media liberando NO en el interior celular. Las curvas concentración respuesta a NPS de ambos grupos experimentales no presentaron diferencia (Fig. 11); el E_{\max} en la relajación fue de $99.75 \pm 1.5\%$ en las preparaciones del grupo control y de $105.8 \pm 1.5\%$ en preparaciones del grupo con Cd^{2+} . Además tampoco se obtuvieron cambios en el pD_2 . Los valores obtenidos fueron $6.9 \pm 0.07\%$ y $7.8 \pm 0.07\%$ del grupo control y con Cd^{2+} respectivamente.

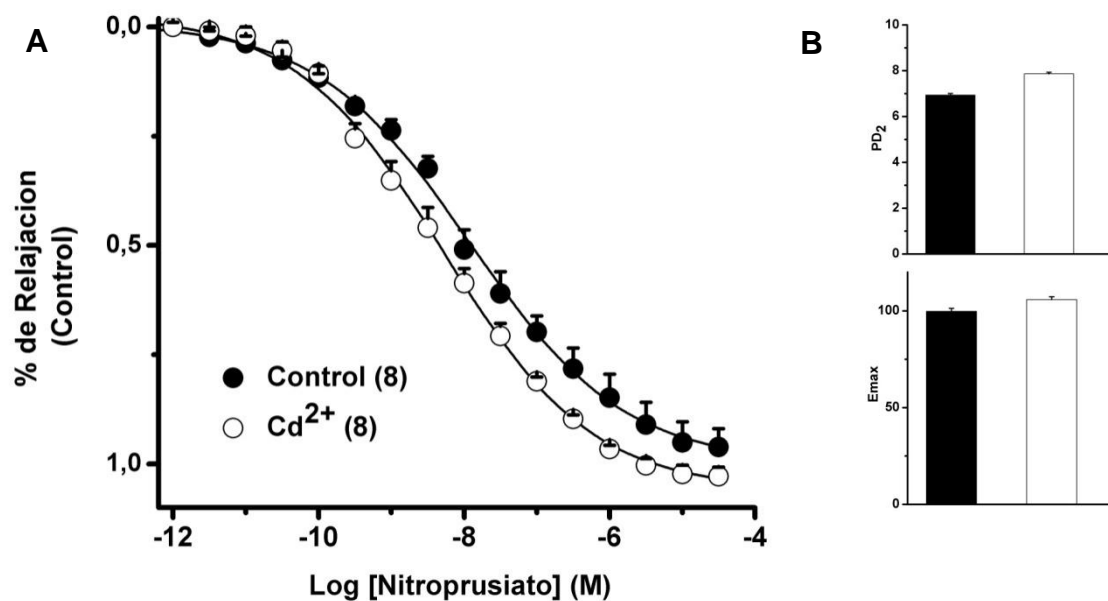


Figura 11. La vía de señalización del Oxido Nítrico no es afectada por la exposición crónica a cadmio. A Se observa la respuesta relajante en respuesta a NPS en ambos grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en la respuesta relajante. **B** se observa que no hay un cambio significativo en el efecto máximo (E_{max}) ni en el pD₂ generado por Nitroprusiato de sodio en el grupo tratado con cadmio. En las curvas y en las barras los resultados se presentan como la media ±EEM.

7.3.4. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre el estrés oxidativo en anillos arteriales de aorta.

La disfunción endotelial inducida por la administración de cadmio no se debe a una alteración en la vía de señalización del NO. En esta sección de resultados se analizó si la disfunción endotelial está relacionada al incremento del estrés oxidativo inducido por la administración crónica de cadmio; para este fin, se repitieron los curvas concentración respuesta a acetilcolina en presencia SOD, un agente barredor de radicales libres.

El efecto inducido por el cadmio en la relajación dependiente de acetilcolina de anillos de aorta fue revertido hasta el nivel basal en los anillos incubados con SOD principal barredor de radicales libres en el organismo, (figura 12). El E_{max} relajante inducido por acetilcolina fue de $77.1 \pm 3\%$ en las preparaciones del grupo control y de $79.2 \pm 1.3\%$ en preparaciones del grupo con Cd^{2+} pero incubadas con SOD. No se obtuvieron cambios en el valor del pD_2 . Los valores obtenidos fueron 7.0 ± 0.07 y 7.0 ± 0.02 para los grupos de control y tratado con Cd^{2+} en la ausencia y presencia de SOD respectivamente.

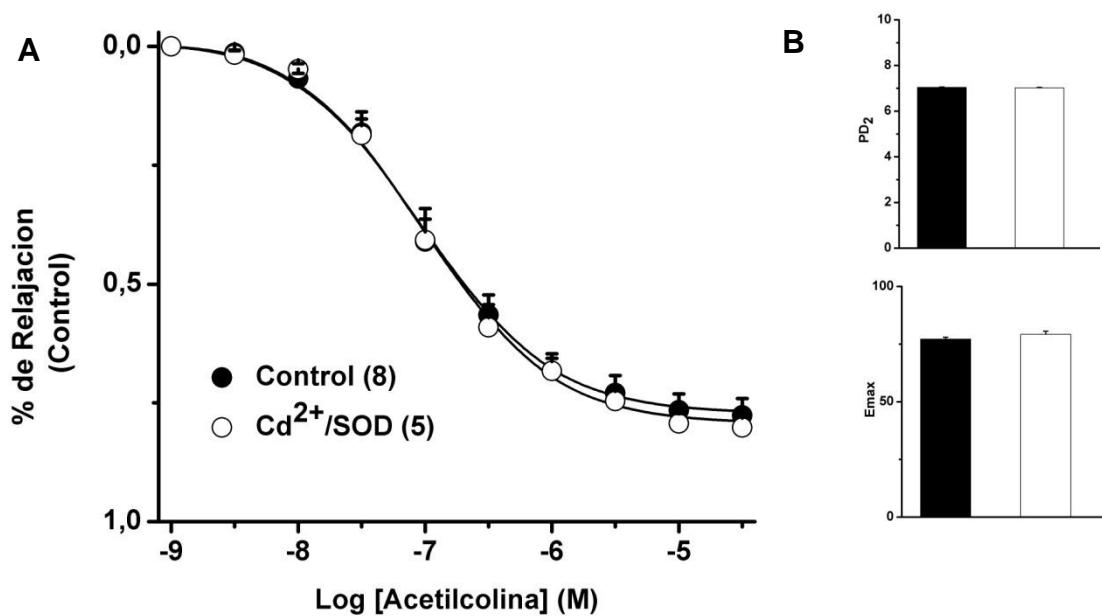


Figura 12. El efecto del Cadmio en los vasos sanguíneos es revertido por acción de la enzima Superóxido Dismutasa. **A** Se observa que los grupos tratados con Cd^{2+} alcanzan una relajación máxima al igual que el grupo control al ser incubados por 15 minutos con un barredor de radicales libres como lo es la enzima Superóxido Dismutasa (SOD). **B** se observa que no hay un cambio significativo en el efecto máximo (E_{max}) ni en el pD_2 generado por la enzima superóxido dismutasa en el grupo tratado con cadmio. En las curvas y en las barras los resultados se presentan como la media \pm EEM.

7.3.5. Efecto de la exposición crónica a cadmio sobre la NADPH oxidasa en anillos arteriales de aorta.

De acuerdo a los resultados previos, en esta sección se analizó si la fuente de los radicales libres superóxido es la NADPH oxidasa. Antecedentes en la literatura proponen que la NADPH oxidasa es la principal fuente superóxido en condiciones en las cuales se ve favorecido un estatus de estrés oxidativo (López-López *et al*, 2002; Hink *et al*, 2001) Las curvas concentración respuesta a acetilcolina fueron realizadas en presencia de apocinina (APO), un inhibidor de la enzima NADPH oxidasa.

El efecto inducido por el cadmio en la relajación dependiente de acetilcolina de anillos de aorta fue revertido hasta el nivel basal en los anillos incubados con APO (figura 13). En estas condiciones, el E_{max} relajante inducido por acetilcolina fue de $77.1 \pm 3\%$ en las preparaciones del grupo control y de $74.6 \pm 1.9\%$ en preparaciones del grupo con Cd^{2+} pero incubadas con APO. No se obtuvieron cambios en el valor del pD₂. Los valores obtenidos fueron 7.0 ± 0.07 y 7.2 ± 0.02 para los grupos de control y tratado con Cd^{2+} en la ausencia y presencia de APO respectivamente.

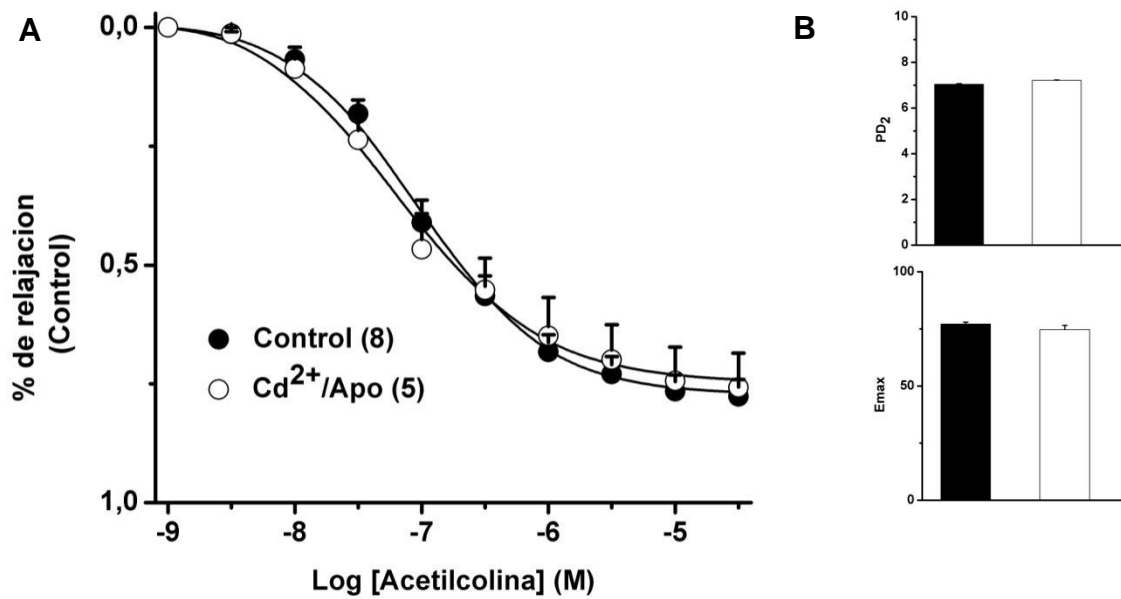


Fig. 13 El efecto del Cadmio en los vasos sanguíneos es revertido por acción de Apocinina. Se observa que los grupos tratados con Cd²⁺ alcanzan una relajación máxima al igual que el grupo control al ser incubados por 15 minutos con un inhibidor de la NADPH oxidasa (APO). **B** se observa que no hay un cambio significativo en el efecto máximo (E_{max}) ni en el pD₂ generado por APO en el grupo tratado con cadmio. En las curvas y en las barras los resultados se presentan como la media ±EEM.

8. DISCUSIÓN.

El principal hallazgo de esta tesis demostró que el tratamiento crónico con Cd²⁺, induce disfunción endotelial; y reduce la variabilidad de la frecuencia cardiaca.

En la disfunción endotelial observada, está involucrada la participación de la NADPH oxidasa, hallazgo que sugiere que el Cd²⁺, un metal pesado, podría contribuir al aumento de la presión arterial reportado en la bibliografía, a través, de la disminución del efecto vasodilatador dependiente del endotelio inducido por la acetilcolina, después de la exposición crónica a Cd²⁺; por otra parte la SOD y el inhibidor de la NADPH oxidasa, (apocinina) revirtieron esta respuesta.

La exposición a Cd^{2+} ha mostrado evidencias con características toxicológicas (OMS, 1992). En la población general, las principales fuentes de intoxicación son los alimentos contaminados y el humo del cigarrillo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008). Trabajadores ocupacionalmente expuestos en la fundición, soldadura, galvanoplastia, refinación, producción de pigmentos, y fabricación de baterías pueden presentar las concentraciones séricas del metal tan altas como 5 a 50 mg. En el presente estudio, se observó que la administración de Cd^{2+} no modificó el E_{max} ni el pD_2 de la curva concentración respuesta a fenilefrina. Estos resultados concuerdan con informes anteriores donde la administración crónica de Cd (0.5 mg/Kg por 4 meses) no modifica la contracción de la fenilefrina en aorta de rata (Tzotzes *et al*, 2007). Recientemente Almenara *et al*, (2013) encontraron que la administración crónica de Cd^{2+} (100 mg/L por 1 mes) no modificó el pD_2 , pero sí incremento de forma significativa el E_{max} . Los resultados de la administración aguda de Cd^{2+} sobre la contracción al agonista α_1 adrenérgico reportan un incremento del E_{max} con 24 horas de incubación, sin cambios en el pD_2 (Takahashi *et al*, 2004), mientras que otros autores no refieren cambios con 8 horas (Tzotzes *et al*, 2007) o 45 minutos (Keli *et al*, 2013) de incubación. Estos resultados sugieren que la capacidad del endotelio para modular negativamente la respuesta contráctil inducida por fenilefrina puede verse afectada en el tratamiento con este metal.

Para investigar la hipótesis de que el Cd^{2+} puede reducir la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), en esta tesis, se generó una contracción con fenilefrina 7 μM para la obtención de la curva concentración respuesta a acetilcolina. El efecto

contráctil de dicha concentración de fenilefrina en las preparaciones de ratas tratadas con Cd^{2+} no fue diferente al presentado por las ratas control. Este hecho lo refieren la mayoría de autores que evalúan el efecto del Cd^{2+} ya sea de forma crónica o aguda. Mejor decir que hay controversia sobre el mecanismo. (Takahashi *et al*, 2004; Tzotzes, *et al*, 2007; Keli *et al*, 2013; Almenara *et al*, 2013).

La interacción del anión superóxido con el NO produciendo peroxinitrito, reduciendo la biodisponibilidad de NO y su efecto relajante (Beckman y Koppenol, 1996; Wolf y Baynes, 2006), por lo tanto en esta tesis, se evaluó si dichas especies oxidativas podrían contribuir a la reducción de la respuesta de la acetilcolina en ratas tratadas con Cd^{2+} . Para este fin, se utilizó una superóxido dismutasa (SOD), una enzima que biotransforma en peróxido de hidrógeno a los aniones superóxido. La SOD incrementó la respuesta máxima de la acetilcolina de preparaciones provenientes de ratas que fueron tratadas crónicamente con Cd^{2+} , lo que sugiere que la exposición al metal causa estrés oxidativo por un posible incremento de radicales superóxido. Aunque no se evaluó aquí la concentración de radicales libres, es ampliamente descrito que el tratamiento crónico de Cd^{2+} incrementa dichas especies (Donpunha *et al*, 2011), por lo que nuestros resultados se basan en estos antecedentes.

El origen del incremento de los radicales superóxido en la pared vascular inducido por Cd^{2+} , aún no está descrito con amplitud. El desequilibrio entre los agentes que inducen los radicales libres con la respuesta compensatoria antioxidante que los metabolizan puede contribuir al incremento del estrés

oxidativo (Wolf y Baynes, 2007; Donpunha *et al*, 2011). La NADPH oxidasa es la fuente principal de estrés oxidativo en el sistema cardiovascular (Hare y Stamler, 2005) y su incremento se ha asociado a patologías cardiovasculares como hipertensión arterial sistémica (Paravicini y Touyz, 2008) e hipertensión pulmonar (López-López *et al*, 2008). Para comprobar si la NADPH oxidasa tiene un papel en la mediación de los efectos de la exposición crónica al Cd^{2+} , se empleó un inhibidor de la NADPH oxidasa no selectivo, apocinina. El tratamiento con apocinina promovió un efecto vasodilatador de la acetilcolina en los anillos aórticos de las ratas tratadas con Cd^{2+} , semejante al efecto observado en las ratas de control. Este hallazgo sugiere que la exposición al Cd^{2+} condujo a un aumento de la actividad NADPH oxidasa, y por lo tanto el incremento en el estrés oxidativo inducido por esta enzima podría reducir la biodisponibilidad del NO.

Nuestros resultados están acordes con los de otros autores (Almenara *et al*, 2013; Keli *et al*, 2013) que proponen que la NADPH oxidasa participa en la hipertensión arterial inducida por el tratamiento con Cd^{2+} , puesto que han encontrado que un inhibidor específico de NADPH oxidasa (apocinina) inhibe la hipercontracción a fenilefrina inducida por Cd^{2+} en aorta de rata.

Por otra parte, a partir del análisis de los parámetros electrocardiográficos, un resultado relevante fue el hallazgo de que el Cd^{2+} modifica la actividad del SNA sobre la función cardíaca. Esta modificación consistió en un desequilibrio simpático-vagal con posible predominio simpático sobre dicha función, lo que determina un factor de riesgo a presentar eventos cardiovasculares adversos.

Es de resaltar que no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros del ECG evaluado, lo que coincide con lo reportado en la literatura especializada. Es aceptado que el Cd^{2+} no afecta la frecuencia cardiaca pero sí desvía el eje T del ECG, un predictor de arritmias ventriculares (Kopp y Hawley, 1976). Otros efectos del Cd^{2+} sobre la electrofisiología cardiaca incluyen bloqueo de la corriente de potasio y de la corriente de calcio tipo L en miocitos ventriculares y bloqueo de la corriente de sodio de fibras de Purkinje. Estos efectos se han explicado con el planteamiento de diversas hipótesis, entre las que se menciona que los cambios inducidos por el Cd^{2+} se deben a:

- A. inhibición de la cadena transportadora de electrones del cardiomiocito.
- B. Daño oxidativo al corazón por una alteración de la defensa antioxidante y a un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno.
- C. Reducción en el flujo coronario (recientemente se ha involucrado al endotelio vascular como órgano diana en las complicaciones de la toxicidad por Cd^{2+} , como se ha discutido en esta tesis).

La disminución de la VFC observada indica una perturbación de la regulación autonómica a nivel cardiaco. En el dominio del tiempo los índices SDNN y RMSSD disminuyeron significativamente en el grupo tratado con Cd^{2+} , la modificación del primer índice refleja la disminución de la variación del periodo de tiempo entre latidos cardiacos consecutivos; sin embargo, la disminución en el valor de RMSSD es considerado como un indicador de que esta disminución de la VFC se encuentra asociada a una alteración en la regulación

parasimpática del sistema nervioso autónomo (Von Borell *et al*, 2007). En el modelo de rata, el análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia proporciona dos parámetros que son aceptados como indicadores de la afectación del sistema nervioso autónomo. A partir de nuestro análisis, se observó una disminución de las oscilaciones de alta frecuencia (HF) en el grupo tratado con cadmio, lo que sugiere una depresión de la regulación vagal sobre la FC en este grupo. Por otra parte de acuerdo a nuestro análisis, se puede mencionar que, el aumento significativo de las oscilaciones de baja frecuencia (LF) observado en el grupo tratado con cadmio puede estar relacionado con un incremento de la modulación simpática sobre la FC ya que tanto el índice RMSSD y el componente de alta frecuencia (HF), marcadores específicos de la modulación parasimpática, están disminuidos significativamente en relación al grupo control. Consistente a lo discutido, el incremento en el valor del cociente LF/HF en el grupo tratado con Cd^{2+} apoya la propuesta planteada por primera vez en esta tesis de que el Cd^{2+} induce una perturbación en el balance simpático-vagal de la función cardiaca.

Debido a las alteraciones cardiovasculares generadas por la exposición crónica a Cd^{2+} a nivel vascular, específicamente las arterias coronarias es posible que las terminales autónomas del corazón sufran daño por isquemia y den lugar así a la presencia de neuropatía autonómica cardiaca. Este planteamiento se apoya en los resultados obtenidos con el análisis de la VFC, la disminución de los indicadores del dominio del tiempo y de la frecuencia muestran una disminución de la influencia parasimpática sobre el nodo sinusal, lo que origina finalmente el desbalance simpático vagal cardiaco.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la exposición crónica a Cd^{2+} , incrementa la producción de anión superóxido a través de la NADPH oxidasa, reduciendo así la biodisponibilidad de NO, disminuyendo la relajación del musculo liso de la aorta, estos cambios podrían también repercutir en la reducción de la perfusión de las arterias donde se encuentran las terminales nerviosas autónomas a nivel cardiaco, lo que puede explicar en parte la reducción de la variabilidad de la frecuencia cardiaca reportada por primera vez en esta tesis.

8.1. Mecanismo contracción-relajación dependiente de Óxido Nítrico en el musculo liso vascular.

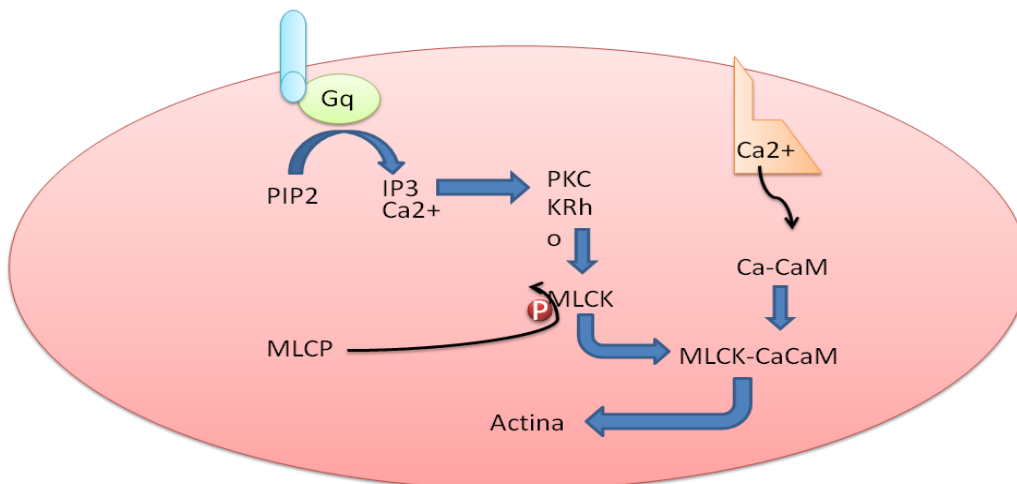


Fig. 14 Mecanismo de contracción de las células del musculo liso vascular. La concentración del ion calcio (Ca^{2+}) intracelular aumenta cuando el Ca^{2+} entra a la célula a través de los canales de calcio tipo L de la membrana celular o por liberación desde el retículo sarcoplásmico (RS). El Ca^{2+} se une a la calmodulina (CaM) para formar un complejo Ca^{2+} -CaM que después activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), ésta a su vez fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC) que al unirse con el complejo Ca^{2+} -CaM producen la contracción muscular lisa. Cuando la concentración de Ca^{2+} disminuye, debido al bombeo fuera de la célula, el proceso se invierte y la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) defosforila la MLC para producir relajación muscular.

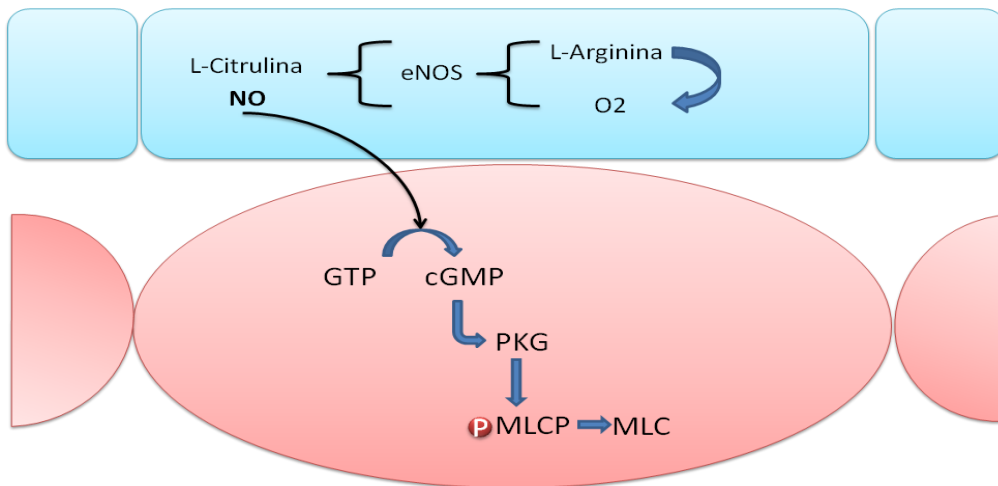


Figura 15. Mecanismo de acción del Óxido Nítrico (NO). Mecanismo mediante el cual se produce la relajación del músculo liso dependiente de Óxido Nítrico. El NO proviene del aminoácido L-Arginina que en presencia de oxígeno dentro de la célula endotelial y mediante la enzima Óxido Nítrico Sintasa (eNOS) forman NO + L-Citrulina. El NO difunde hacia la célula del músculo liso vascular (CMLV) donde provoca la defosforilación del Guanosil Trifosfato (GTP) en Guanosil Monofosfato Cíclico (cGMP) que activa la Proteína Quinasa G encargada de fosforilar a la Fosfatasa de la Cadena Ligera de la Miosina (MLCP) impidiendo que se lleve a cabo el proceso de contracción muscular.

8.2. Mecanismo general de daño a nivel vascular por cadmio.

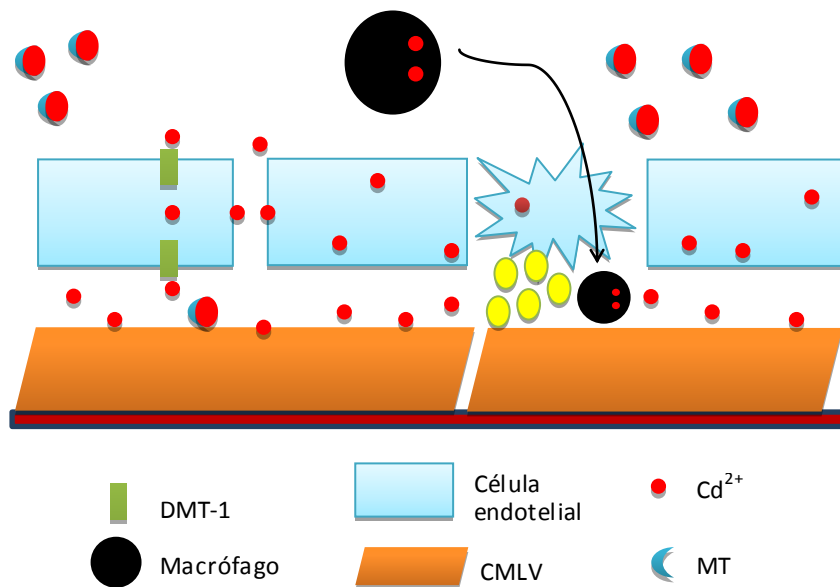


Figura 16. Mecanismo mediante el cual el cadmio genera disfunción endotelial y daño vascular. Una vez que el cadmio alcanza el torrente sanguíneo ingresa a las células endoteliales mediante los transportadores celulares DMT-1 que es un transportador de metales divalentes; una vez dentro puede generar daño en diversos organelos y sistemas intracelulares, favoreciendo la señalización apoptótica y/o necrótica que ocasionara la muerte celular. El cadmio en el torrente sanguíneo es fagocitado por los macrófagos, el cual se aloja en las CMLV donde se diferencian en células espumosas generando una placa de ateroma. Cuando el cadmio se encuentra a nivel intracelular ejerce un efecto sobre los enlaces caderina-caderina generando un espacio intercelular donde el cadmio libre o los complejos Cd-MT podrán llegar con facilidad a la CMLV.

9. CONCLUSIÓN.

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que el cadmio induce la presencia de disfunción endotelial y disminución de la VFC. La disminución de la relajación dependiente de NO fue revertida por la presencia en superóxido dismutasa, un barredor del anión superóxido y por apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa. Estos hallazgos sugieren que el efecto del cambio se debe al

incremento del estrés oxidativo por incremento de la actividad y/o expresión de la NADPH oxidasa. Si este efecto ocurre también a nivel de las coronarias, es posible que las terminales autónomas del corazón sufran daño por isquemia y den lugar así a la presencia de neuropatía autonómica cardiaca. Este planteamiento se apoya en los resultados obtenidos con el análisis de la VFC, este hecho mostró una disminución de la influencia parasimpática sobre el nodo sinusal, lo que origina finalmente el desbalance simpático vagal cardiaco. Esta tesis documenta una relación de la exposición crónica a cadmio con disfunción endotelial y la disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca. El cadmio, entonces altera la regulación del sistema nervioso autónomo a nivel cardiaco y afecta el mecanismo de vasodilatación dependiente de óxido nítrico; siendo así un factor para desarrollar enfermedades cardiovasculares como alteraciones eléctricas cardiacas, enfermedades coronarias e hipertensión arterial sistémica. Estudios posteriores podrán aclarar el mecanismo subyacente de estas patologías.

10. BIBLIOGRAFIA:

Abu HS, Sian M, Jones KG. Cadmium accumulation in aortas of smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:863–867.

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

Almenara CC, Broseghini GB, Vescovi MV, Keli JA, De O. T, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. *PLOS ONE.* 2013; Volume 8, Issue 7. 1-8.

Almenara CP, Broseghini-Filho GB, Vescovi MV, Keli JA, De Oliveira T, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. *PLOS ONE.* 2013; 8(7): e68418.

Ando M, Matsui S, Jinno H, Takeda M. Urinary excretion of cyclic AMP in cadmium-intoxicated rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1989; 27: 307–315.

Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F, Breem R, Denef C, Van de Werf F, Ector H. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed.* 1999; 60(3): 197-213.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271 (5 Pt 1): C1424–37.

Chao SH, Bu CH, Cheung WY. Stimulation of myosin light-chain kinase by Cd^{2+} and Pb^{2+} . *Arch. Toxicol.* 1995; 69: 197–203.

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* 2002; 59: 627–647.

Dailianis S, Kaloyianni M. Role of cAMP in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* as a potent biomarker of cadmium in marine environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007; 52: 371–378.

Donpunha W, Kukongviriyapan U, Sompamit K, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Patchareewan. Protective effect of ascorbic acid on

cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals*. 2011; 24:105–115.

Flora SJ. Heavy metal induced oxidative stress and its posible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med Res.* 2008; 128: 501-523.

Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Nordberg GF. Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Approach. CRC Press, Boca Raton, FL. 1986.

Gunnar FN. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 238: 192–200.

Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica. Elsevier España, S.L. 12ª edición 2011.

Hare JM, Stamler JS. NO/Redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*. 2005; 115 (3): 509–517.

Hink U, Tsilimingas N, Wend M, Münzel T. Mechanisms Underlyng Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ Res*. 2001; 88: e14-e22.

IARC. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Scientific Publications, Lyon. 1993; pp. 1–415.

Kai C, Ching H, Shing L, Chin S, Cheng Y, Ming L, Kuo C, Tsung H, Dong H, Chin W, Yi S, Ya C, Chun H. Cadmium Induces Apoptosis in Pancreatic b-Cells through a Mitochondria-Dependent Pathway: The Role of Oxidative Stress-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation. *PLOS ONE*. 2013; 8(2): e54374.

Karakaya O, Barutcu I, Kaya D. Acute effect of cigarette smoking on heart rate variability. *Angiology*. 2007; 58: 620–624

Keli JA, Cruz AC, DeOliveira TA, Stefanon IA, Simão AA, Valentim DA. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 65: 838–848.

Keli JA, Almenara CP, De Oliveira T, Stefanon I, Simão A, Vassallo DV. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 838–848.

Koop SJ, Hawley PL. Factors influencing cadmium toxicity in A-V conduction system of isolated perfused rat heart. *Toxicology and applied pharmacology*. 1976; 37: 531-544.

Kopp SJ, Hawley PL. Factors influencing cadmium toxicity in A–V conduction system of isolated perfused rat heart. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1976; 37: 631–644.

Kostrzewska A, Sobieszek A. Diverse actions of cadmium on the smooth muscle myosin phosphorylation system. *FEBS Lett*. 1990; 263: 381–384.

Leverrier P, Montigny C, Garrigos M, Champeil P. Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited. *Anal. Biochem*. 2007; 371: 215–228.

Liu Y, Templeton DM. Cadmium activates CaMK-II and initiates CaMK-II dependent apoptosis in mesangial cells. *FEBS Lett*. 2007; 581: 1481–1486.

López-López JG, Moral J, Frazziano G, Gomez MJ, Flores J, Monjaraz E, Cogolludo A, Pérez F. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295: L727–L732.

Merali Z, Kacew S, Singhal RL. Response of hepatic carbohydrate and cyclic AMP metabolism to cadmium treatment in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1975; 53: 174–184.

Merali Z, Singhal RL. Influence of chronic exposure to cadmium on hepatic and renal cyclic AMP-protein kinase system. *Toxicology*. 1975; 4: 207–214.

Messner B, Bernhard D. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *Biometals*, 2010; 23: 811–822.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

NORMA Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes.

NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

Paravicini TM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; (Suppl. 2):S170–S180.

Prozialeck WC, Edwards JR, Woods JM. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.* 2006; 79: 1493–1506.

Prozialeck WC. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Science.* 2006; 79: 1493-1506.

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

Thévenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be?. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2009; 221-239.

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

Tzotzes V, Tzilalis V, Giannakakis S, Saranteas T, Papas A, Mourouzis L, Mourouzis C, Zarros A, Pantos C, Cokkinos D, Carageorgiou H. Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. *BioMetals* 2007; 20:83–91.

Vesna M. Route-dependent effects of cadmium/cadmium magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver, *Food and Chemical Toxicology.* 2012

Wiergosz R. Cadmium Distribution and Toxicity in Tissues of Small Rodents. *Microscopy research and technique.* 2001; 55:208–222.

Wolf MB, Baynes JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *BioMetals.* 2007; 20:73–81.

Wolf MB. Cadmium and mercury cause and oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *BioMetals.* 2007; 20: 73-81.

World Health Organization. Who International Programme on Chemical Safety (IPCS). Cadmium. Environmental Health Criteria. Geneva, Switzerland.1992; 134.

Yoopan N, Watcharasit P, Wongsawatkul O, Piyachaturawat P, Satayavivad J. Atenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. Toxicology Letters. 2008; 176: 157-161.

11. ANEXOS.

11.1. Reconocimientos por los resultados obtenidos a partir de esta tesis.



A TRAVÉS DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

**A: García-González MA, Vancini-Becerra G, García-Ramírez MA, Mena-Contla A,
Atonal-Flores F, López-López JG**

Por haber obtenido el PRIMER lugar en la modalidad de: CARTELES

Con el trabajo:

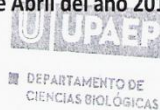
**EL HÁBITO DE FUMAR INDUCE LA PRESENCIA DE
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y DAÑA EL BALANCE SIMPÁTICO
VAGAL CARDÍACO**

V JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Del 29 al 30 de abril de 2014

“La Cultura al Servicio del Pueblo”

30 de Abril del año 2014

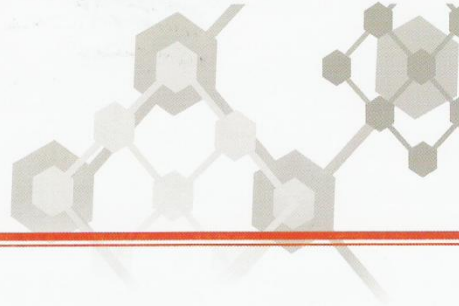


MDCS. María Elena Fonz Cabrera
Coordinadora del Área de Biología

Mtro. Fernando Morales Salgado
Coordinador de las Jornadas



RED
Red Nacional de Actividades
Juveniles en Ciencia y Tecnología



Atlixco, Puebla, a 22 de mayo de 2014.

La RED Nacional de Actividades Juveniles en Ciencia y Tecnología (la RED), la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP) y el Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA), con el aval del Movimiento Internacional para el Recreo Científico y Técnico (MILSET), hacen constar que el proyecto:

Proyecto: DAÑOS CARDIOVASCULARES INDUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A CADMIO

Institución: BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

Municipio: Puebla

Autor(es):
Miguel Angel García González
Ana Cecilia Palafox Gómez

Asesor(a):
JosÉ Gustavo LÓpez Y LÓpez

Categoría: Superior

Área: Biología

En la ExpoCiencias Puebla 2014, realizada los días 21 y 22 de mayo en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA) ha obtenido la acreditación para participar en la **EXPOCIENCIAS NACIONAL 2014**.

Atentamente

Mtro. Roberto Hidalgo Rivas
Coordinador General de la RED Nacional
Presidente de MILSET



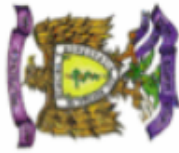
UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

21 Sur 1103, Col. Santiago. C.P. 72410, Puebla, Pue. MEXICO
Tel. (222) 2299400 Ext. 7595 Fax. (222) 2325251
www.expo-ciencias.net





XXXVI Congreso Nacional de Farmacología
XII Congreso de Investigación en Medicina de la ESM-IPN
XVI Congreso Estudiantil de Farmacología en honor al Dr. Sergio Estrada Parra
Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo, Presidenta Honoraria del Congreso



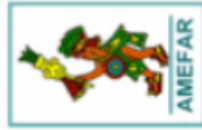
Otorga constancia a:

**García González Miguel Angel, Vancini Becerra Gonzalo, Mena
Contla Armando, Atonal Flores Fausto, López y López José
Gustavo**



Por su destacada participación como SEMIFINALISTA(S) con la ponencia:

**LA EXPOSICION A CADMIO INDUCE DISFUNCION ENDOTELIAL Y DAÑA
EL BALANCE SIMPATICO VAGAL CARDIACO**



*Unidad Politécnica para el Desarrollo Empresarial y para la competitividad del IPN
Ciudad de México, D. F., del 12 al 14 de mayo de 2014.*
Por el Comité Organizador

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro
Presidente de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.