

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

ESTUDIO DE LA RESPUESTA VASODILATADORA DEPENDIENTE E  
INDEPENDIENTE DE ENDOTELIO, INDUCIDA POR ACETILCOLINA Y  
NITROPRUSIATO DE SODIO RESPECTIVAMENTE, EN EL TRANSCURSO DE  
LA INTOXICACIÓN CON PLOMO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

PRESENTA:

GERARDO DANIEL MEJÍA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

D en C IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

México D. F.

2005

**ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FARMACODINAMIA DE  
LA SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR.  
IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ**

## INDICE

<b>RELACIÓN DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>GLOSARIO .....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
1. CONTROL DEL TONO VASCULAR .....	19
A. Relajación y contracción dependiente de endotelio .....	20
B. Fármacos que producen relajación vascular independiente del endotelio pero dependiente de NO.....	28
C. Fármacos que producen relajación vascular dependiente del endotelio y dependiente de NO.....	29
2. INTOXICACIÓN POR PLOMO .....	31
A. Características de la intoxicación.....	31
B. Mecanismo de toxicidad de los metales pesados .....	32
C. Plomo e hipertensión .....	33
D. Plomo y el sistema NO/GSs.....	34
E. Plomo y stress oxidativo .....	36
F. Disfunción endotelial inducida por Pb .....	39
3. TOXICIDAD SUBCLÍNICA. ....	40
<b>II. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....</b>	<b>42</b>
<b>III. HIPOTESIS .....</b>	<b>43</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>

1.	OBJETIVO GENERAL.....	43
2.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	43
<b>V.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>44</b>
1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
A.	Evaluación de la presión arterial.....	45
B.	Efecto del plomo sobre la relajación inducida por acetilcolina en los anillos de aorta de rata tratada durante 10, 30 o 90 días con acetato de sodio o de plomo.....	47
C.	Efecto del plomo sobre la relajación inducida por nitroprusiato de sodio en los anillos de aorta de rata tratada durante 10, 30 o 90 días con acetato de sodio o de plomo.....	47
D.	Efecto del plomo sobre la expresión de la SONE y la GCs en los anillos de aorta de rata tratada durante 10, 30 o 90 días con acetato de sodio o de plomo.....	47
2.	FÁRMACOS UTILIZADOS.....	57
3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
1.	EFFECTO DE LA INTOXICACIÓN CON PLOMO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	58
2.	EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO INDUCIDA POR LA ACETILCOLINA.....	59
3.	EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA RELAJACIÓN INDEPENDIENTE DEL ENDOTELIO PRODUCIDA POR EL NITROPRUSIATO DE SODIO.....	61

4.	EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA NOS/GCs EN ANILLOS AÓRTICOS DE RATA EN EL TRANCURSO DE LA INTOXICACIÓN CON PLOMO.....	63
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
1.	Efecto del plomo en el transcurso de la exposición sobre la presión arterial media. ....	66
2.	Efecto del plomo (50 ppm) en el transcurso de la exposición sobre la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina.....	68
3.	Efecto del plomo (50 ppm) en el transcurso de la exposición sobre la relajación independiente del endotelio inducida por nitroprusiato de sodio.....	73
<b>VIII.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>74</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA. ....</b>	<b>77</b>

## RELACIÓN DE FIGURAS

**Fig. 1:** Factores relajantes derivados del endotelio, agentes que inducen su liberación, la vía sintética y su mecanismo de acción.

**Fig.2:** Mecanismos moleculares subyacentes en la relajación del músculo liso mediado por GMPc.

**Fig. 3:** Mecanismo por el cual la sintasa de NO contribuye a la formación de radicales libres.

**Fig. 4:** Fuentes de stress oxidativo.

**Fig. 5:** Metabolismo del NO.

**Fig. 6:** Diagrama que muestra el flujo del protocolo experimental.

**Fig. 7:** Esquema del modelo experimental empleado para evaluar la reactividad vascular en anillos de aorta de rata.

**Fig. 8:** Efectos del tratamiento con acetato de plomo (50 ppm) sobre la presión arterial de las ratas.

**FIG. 9:** Efectos del tratamiento con Pb (50 ppm) o acetato de sodio (57 ppm) sobre la relajación inducida por acetilcolina en las preparaciones aórticas.

**FIG. 10:** Efectos del tratamiento con Pb (50 ppm) o acetato de sodio (57 ppm) sobre la relajación inducida por nitroprusiato de sodio en preparaciones aórticas.

**FIG. 11:** Expresión de la NOSe en anillos aorticos de rata intoxicada con 50 ppm de acetato de plomo o 57 ppm de acetato de sodio (control)

**FIG. 12:** Expresión de la GCs en anillos aórticos de rata intoxicada con acetato de plomo (50 ppm) o acetato de sodio (57 ppm).

## DEDICATORIA

*A MI ESPOSA POR SU APOYO Y PACIENCIA*

*A MIS HIJOS POR EL TIEMPO AUSENTE*

*A MIS PADRES POR DARME LA VIDA*

*A MIS ABUELOS POR SU EJEMPLO DE ENTEREZA*

*A MIS HERMANOS POR LO COMPARTIDO*

*Al DR. IGNACIO VALENCIA POR SU AMISTAD Y GUIA*

*A MIS MAESTROS POR SUS ENSEÑANZAS Y PACIENCIA*

*A MIS AMIGOS POR SU AMISTAD INCONDICIONAL*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional por ser una institución pilar fundamental de la investigación en México y por darme los conocimientos necesarios para concluir mis estudios, herramienta indispensable en mi desarrollo profesional, no solo por la infraestructura sino por la familia que halle entre mis compañeros y maestros, así también agradezco la beca otorgada para concluir esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría. No. de becario: 176423.

## GLOSARIO

**AMPc** MONOFOSFATO CICLICO DE ADENOSINA: Segundo mensajero

**ATP** TRIFOSFATO DE ADENOSINA: Ribonucleosido 5'-trifosfato que actúa como dador de grupo fosfato

**COX** CICLOOXIGENASA: Enzima que cataliza la formación de prostaglandinas por la oxidación de ácido araquidónico

**EET** ACIDOS EPOXIEICOSATETRAENOICOS: Productos derivados de la vía de la lipooxigenasa

**eNOS** SINTASA DE OXIDO NITRICO: Enzima que interconvierte a la L-arginina en L-citrulina y oxido nítrico

**FHDE** FACTOR HIPERPOLARIZANTE DERIVADO DE ENDOTELIO: factor relajante producido por el endotelio de naturaleza desconocida

**GCs** GUANILATO CICLASA SOLUBLE: Enzima que cataliza la conversión de GTP a CMPC

**GMPc** MONOFOSFATO CICLICO DE GUANOSINA: Segundo mensajero involucrado entre otros efectos como mediador de vasodilatación

**IP3** TRIFOSFATO DE INOSITOL: segundo mensajero derivado de fosfolipidos de membrana en una reaccion catalizada por la fosfolipasa C

**NO** OXIDO NITRICO: Radical libre con diversos efectos que actúa como neurotransmisor , produce vasodilatación, participa en la respuesta inmune, etc

**Pb** PLOMO: Elemento metálico del grupo IV de la tabla periódica, empleado ampliamente debido a sus propiedades fisicoquímicas y a los compuestos que forma, sin embargo es altamente tóxico.

**PGI<sub>2</sub>** PROSTACICLINA: Prostaglandina involucrada en la vasodilatación

**PKG I** PROTEIN CINASA G I: Cinasa involucrada en el proceso de la vasodilatación activada principalmente por el GMPc.

**ROS** ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO: radicales libres derivados de oxígeno

**TXA<sub>2</sub>** TROMBOXANO A2: Producto derivado de lípidos a través de la ciclooxigenasa

## RESUMEN

La exposición crónica a bajas dosis de plomo (0.1-100 ppm) produce hipertensión arterial tanto en humanos como en animales experimentales. Este padecimiento se ha asociado a un incremento en la actividad del eje renina angiotensina aldosterona, en las sustancias vasoconstrictoras producidas por el endotelio, en los niveles de epinefrina plasmática; así como una disminución en la densidad de receptores  $\beta$  en los vasos sanguíneos. Adicionalmente, el plomo puede inactivar la acción de las enzimas hemo, tales como la guanilil ciclasa soluble (GCs), que junto con un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) reducen la acción y biodisponibilidad del NO. Este último es un gas generado, entre otros tejidos, por el endotelio; que lo sintetiza a través de la conversión de la L-arginina en L-citrulina por acción de la sintasa de NO (eNOS). El NO actúa en células musculares lisas en donde actúa sobre la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) activándola, resultando en incremento en los niveles de GMPc y en vasodilatación. A pesar de la información anterior y a que la intoxicación en forma crónica con plomo es relevante, no existen estudios en que se evalué temporalmente la intoxicación a nivel vascular. En particular, se desconoce el efecto del plomo sobre la síntesis y acción del NO en el transcurso de la intoxicación. Por lo tanto el objetivo de este estudio es evaluar la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina y nitroprusiato de sodio en anillos aorticos de ratas tratadas con acetato de plomo (50 ppm) durante 10, 30 y 90 días, así como evaluar la expresión de la NOSe y de la GCs en el transcurso de la intoxicación con plomo. Los resultados obtenidos muestran un incremento en la respuesta vasodilatadora

inducida por acetilcolina pero no aquella por el nitroprusiato de sodio en el grupo de 10 días, efectos asociados a un incremento en la producción de NOSe pero no en la producción de GCs. Estos efectos se revierten en el grupo de 30 días. Por el contrario, en el grupo tratado durante 90 días se observó un decremento en la relajación inducida por los vasodilatadores arriba mencionados y en la expresión de NOSe y de GC. Los resultados muestran que en el transcurso de la intoxicación con plomo ocurren cambios adaptativos en la síntesis y acción del óxido nítrico manifestados en etapas tempranas (10 días de tratamiento) como un incremento en la vasodilatación dependiente del endotelio, efecto que puede explicarse por un probable incremento en la síntesis de NO, ya que en forma paralela se incrementó la expresión de la NOSe. Sin embargo y a medida que se prolonga el tiempo de la intoxicación, el efecto observado en el grupo de 10 días se supera de tal forma que no se observa en el grupo de 30 días y en el grupo de 90 días, donde se reduce no solo la relajación dependiente del endotelio sino también aquella independiente del endotelio. El efecto anterior puede ser explicado por una probable reducción tanto de la síntesis como de la acción del NO, ya que en forma congruente se redujo la expresión de la NOSe y de la GC.

## **ABSTRACT**

Chronic exposure to low levels of lead ranging from 0.1 to 100 ppm, results in hypertension in human and in experimental animals. This hypertension has been associated with an increase in the renin-angiotensin system, an increase in the endothelium-derived vasoconstrictor substances, the plasmatic epinephrine is elevated and there is a reduced density in the  $\beta$  adrenergic receptors in the vascular smooth muscle. Besides, lead can inactivate the heme containing enzymes such as soluble guanylate cyclase (GCs), plus diminished NO production or enhanced sequestration due to reactive species of oxygen (ROS), decreasing the production or the action of the NO, which is a gas generated by the endothelium through conversion of L-arginine to L-citrulline by the activity of the nitric oxide synthase (eNOS). NO induce vasodilatation through the stimulation of GCs in the smooth muscle cells. In spite of the previous information and the relevant role of the lead intoxication, there are no studies evaluating time course of the vascular lead intoxication. Particularly, the lead effect upon the NO action or synthesis is not known. Therefore the aim of the present study was to evaluate the endothelium dependent and independent vasodilating responses induced by acetylcholine and sodium nitroprusside respectively in thoracic aorta from rats intoxicated with lead acetate (50 ppm) during 10, 30 and 90 days. Also, the expression of  $\beta$ 1 subunit of the GCs and the eNOS was evaluated.

The results obtained show an increase in the vasodilating response elicited by acetylcholine but not the one induced by sodium nitroprusside in the 10 days group, such effects are associated with an increase in the expression of the NOSe but no

for the GCs. These effects are reverted in the 30 group days, whereas the 90 day group shows a reduction in the vasodilating response induced by the vasodilators above mentioned and also this group shows a decrement in the expression of NOSe and GCs. The results show that during the intoxication period, adaptative changes can occur in the synthesis and action of the NO which are expressed in early stages (10 day of intoxication) as an increased in the endothelium dependent vasodilation. This can be explained probably for an enhanced synthesis of NO, due to an increased in parallel of the expression of NOSe. However as intoxication time increases, the effect observed in the 10 day group is override such as in the 30 day group is not observed any more and in the 90 day group both the endothelium dependent and independent relaxation is reduced. The results above can be explained for a reduction in the action or synthesis of NO, because the GCs and the NOSe also are reduced in a similar way.

## I. INTRODUCCIÓN

El sistema cardiovascular, a través del flujo sanguíneo, provee un gradiente de perfusión de nutrientes y oxígeno de la sangre hacia las células y en la dirección opuesta para desechos, de tal forma que el papel principal del aparato circulatorio es participar en el intercambio de oxígeno y bióxido de carbono, así como distribuir distintas moléculas para la nutrición, reparación, y crecimiento celular<sup>9</sup>. Además y entre otras funciones destacan, que representa el vehículo para distintas moléculas como por ejemplo las hormonas, disipa el calor corporal y media la respuesta inflamatoria en contra de microorganismos invasores.<sup>9</sup> Para satisfacer las demandas tisulares de nutrientes y oxígeno, el sistema requiere una regulación complicada e integral del gasto cardíaco (determinado por la frecuencia cardíaca y el volumen latido),<sup>9</sup> así como de una regulación de las resistencias periféricas (mantenida fundamentalmente por los esfínteres precapilares en la microcirculación). La presión arterial es directamente proporcional al gasto cardíaco y a las resistencias periféricas. El flujo sanguíneo es regulado por el sistema nervioso simpático; el cual participa en el control del tono vascular y junto con el parasimpático en el control del gasto cardíaco. El simpático ejerce sus acciones a través de la liberación de su neurotransmisor, la noradrenalina, que en los vasos sanguíneos estimula fundamentalmente los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  para producir contracción vascular y consecuentemente incremento del tono y la presión arterial. Además, en corazón, la estimulación del simpático incrementa la actividad cardíaca, fundamentalmente a través de la estimulación beta adrenérgica. Por otro lado, el endotelio vascular participa en la regulación local del



tono vascular y consecuentemente en la de la resistencia periférica secretando distintas sustancias vasoactivas.<sup>9</sup> Dentro de estas se encuentra el NO, formado por la acción catalítica de la sintasa de óxido nítrico, el cual produce vasodilatación al estimular a la enzima guanilil ciclasa soluble en el músculo liso vascular.

Existen diferentes factores que pueden alterar el funcionamiento del sistema cardiovascular y por lo tanto conducir a un aporte inadecuado de nutrientes y oxígeno a los tejidos y a deterioro de los mismos<sup>46</sup>. Dentro de esos factores se encuentra la exposición al Pb. La exposición a bajas dosis de este metal se ha relacionado con un incremento sostenido de la presión arterial<sup>5,47,49,81,84,89,93,94</sup>. El mecanismo por el cual se incrementa la presión arterial no esta completamente aclarado. De tal forma que a pesar de que existen varios estudios de las acciones del plomo sobre el aparato circulatorio, se tiene evidencia insuficiente de los fenómenos que ocurren en el transcurso de la intoxicación, específicamente no se ha estudiado la posible afectación que sufre el sistema NO/GCs en los vasos arteriales, aspecto que se revisa en este trabajo.

## **1. CONTROL DEL TONO VASCULAR**

El músculo liso vascular se puede considerar como un sistema efector localizado entre dos sistemas de regulación: el sistema nervioso autónomo y el endotelio vascular<sup>101</sup>. El endotelio vascular es fundamental en el control del músculo liso vascular y por lo tanto en el flujo sanguíneo local, al liberar sustancias vasocontractiles y vasodilatadoras como respuesta a diversos estímulos<sup>28</sup>. Estos últimos pueden ser de naturaleza física como el estrés por fricción, la presión y la hipoxia<sup>101</sup>; o pueden ser producidos a través de estímulos químicos mediados o

no por receptores específicos de cada uno de ellos. Las sustancias producidas por el endotelio de acuerdo a su acción sobre el músculo liso, pueden clasificarse como vasocontractiles o vasodilatadores.

### **A. Relajación y contracción dependiente de endotelio**

El endotelio posee un papel dual en el control del tono vascular, secretando factores relajantes como el NO, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE) y adenosina (fig. 1), en adición a factores contráctiles como la endotelina y los prostanoides, específicamente el tromboxano  $A_2$  y la prostaglandina  $H_2$  (fig. 2) <sup>43,45,69,74,112</sup>. El tono de los vasos es resultado del balance entre todos estos factores, así como también de la capacidad de las células del músculo liso para responder a ellos. La relajación dependiente del endotelio puede ser estimulada por distintas sustancias de naturaleza endógena (como por ejemplo la acetilcolina, la noradrenalina, ATP, sustancia P), hormonas circulantes (adrenalina, vasopresina, angiotensina, insulina), sustancias provenientes de las plaquetas y del sistema de la coagulación (serotonina, ADP, trombina) o mediadores liberados de las mismas células endoteliales o de la pared de los vasos (bradicinina, ADP/ATP, endotelina, histamina, angiotensina), ver fig. 1. <sup>3,36,69,101</sup> Dada su importancia en el control del tono vascular local y para la discusión de los resultados obtenidos en la presente tesis, mencionaremos los aspectos más relevantes del NO, el FHDE y la prostaciclina.

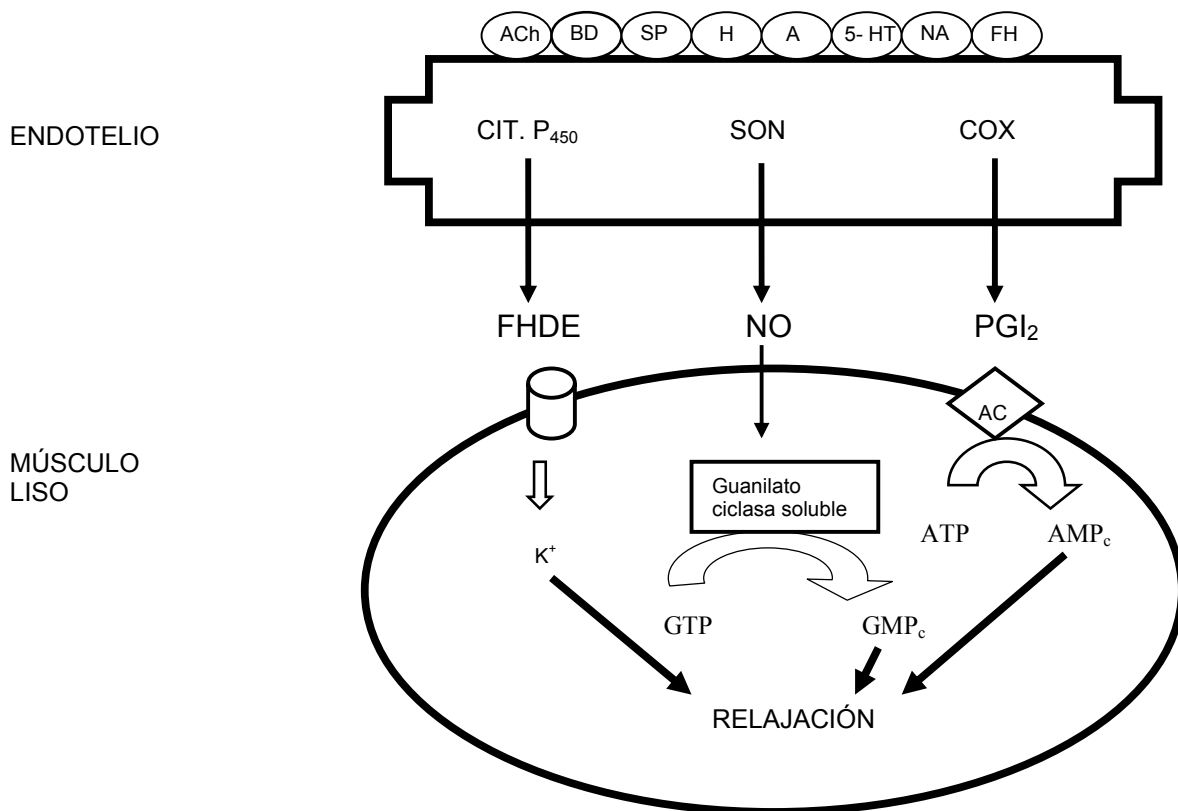


Fig. 2: Factores relajantes derivados del endotelio, agentes que inducen su liberación, la vía sintética y su mecanismo de acción.

Distintos estímulos de naturaleza química (ACh, acetilcolina; BD, bradicinina; SP, sustancia P; H, histamina; A, adenosina; 5-HT, serotonina y NA, noradrenalina) o física (F.H., factores hemodinámicos) activan la vía sintética para la formación y liberación de los factores relajantes derivados del endotelio. El FHDE (factor hiperpolarizante derivado del endotelio) se forma a través de la vía del citocromo P<sub>450</sub> y produce relajación del músculo liso vascular al favorecer la salida de iones K<sup>+</sup> y provocar hiperpolarización. El NO (óxido nítrico) proviene de la L-arginina gracias a la catálisis de la sintasa de óxido nítrico (SON) e induce relajación por elevar los niveles intracelulares de GMP<sub>c</sub> al estimular a la guanilato ciclasa soluble. La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) es sintetizada en la vía de la ciclooxigenasa (COX) y provoca relajación al estimular receptores propios que están acoplados a la adenilato ciclasa (AC), por elevar los niveles de AMP<sub>c</sub>.

**Oxido nítrico.** Furchgott y Zawadski<sup>38</sup> en 1980 propusieron que el endotelio estimulado con acetilcolina secreta un factor relajante, el cual se identificó como NO o un compuesto nitroso estrechamente relacionado<sup>37,50,86</sup> El NO se sintetiza

por acción de enzimas llamadas sintasas de óxido nítrico (SON) de las cuales existen varias isoformas: constitutivas e inducible, las primeras agrupan a dos: la endotelial y la neuronal. También se han clasificado en I, II, III, (neuronal, inducible y endotelial) y se encuentran codificadas en los cromosomas humanos 12, 17 y 7 respectivamente<sup>35,109</sup>; la I y III son calcio dependientes mientras que la otra es independiente de calcio. Todas convierten a la L-arginina en NO y L-citrulina, al oxidar el nitrógeno guanidino de la L-arginina.<sup>100</sup> La sintasa endotelial de NO (eNOS) como se mencionó anteriormente es una enzima constitutiva, de 135 kDa<sup>32</sup> que requiere de cofactores para realizar su función tales como la calmodulina, la tetrahydrobiopterina, el flavin mononucleotido y el NADPH<sup>33</sup>. La tetrahydrobiopterina es un factor esencial en la síntesis de NO y su ausencia, así como la oxidación de esta, impide la formación del NO.<sup>44,102</sup> El complejo calcio calmodulina es esencial para activar a las enzimas constitutivas; sin embargo, evidencia reciente sugiere que el estrés por fricción puede dar lugar también a la formación de NO de manera independiente de calcio.<sup>32</sup>

El NO producido en las células endoteliales difunde hacia la musculatura lisa del vaso donde se une con la guanil ciclasa (GCs). La GC son enzimas que catalizan la conversión de GTP a cGMP y se presentan en dos grandes variantes: la soluble y la unida a membranas. Se han descrito múltiples isoformas de cada una de ellas. El NO activa a la soluble (GCs). Esta última representa una enzima dimerica que consta de dos subunidades, una  $\alpha$  y una  $\beta$ . Aunque ambas subunidades poseen sitios catalíticos es necesaria la presencia de las dos para efectuar su función.<sup>13</sup> Además existen distintas isoformas de las subunidades, la  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , la  $\beta_1$  y la  $\beta_2$ , de

las cuales las presentes en músculo liso vascular son la  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  que se encuentran codificadas en el cromosoma 4, en la zona q31.3-q33 <sup>67</sup>. La GCs activada por el NO provoca la transformación de GTP a GMPc, el incremento en los niveles de este último se asocia a vasodilatación por mecanismos aún no totalmente aclarados. Sin embargo, se sabe que el GMPc producido a partir de la interconversión de GTP por acción del la GCs activa a la PKG I; cabe hacer mención que el AMPc es capaz de activarla también, aunque a concentraciones mayores<sup>72</sup>. Se ha sugerido que La PKG I activada actúa como un modulador soluble de la concentración del  $Ca^{2+}$  actuando sobre diversas proteínas: el receptor de  $IP_3$ , el fosfolambam, la fosfo proteína vasodilatadora y la vicentina.<sup>66, 67</sup> Las tres primeras acciones de la PKG I se relacionan con la relajación del músculo liso. Por otro lado, la PKG I también es capaz de fosforilar al receptor de tromboxano  $A_2$  los cuales se consideran blancos clásicos.<sup>66, 67</sup> Otros blancos posibles de la PKG I recientemente descritos, aunque existe conflicto con la evidencia que respalda dicha hipótesis son: el canal tipo L de  $Ca^{2+}$  y el canal de  $Ca^{2+}$  activado por  $K^+$ , la subunidad de unión a miosina de la fosfatasa de cadena ligera de la miosina, la fosfolipasa  $A_2$  y la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $Ca^{2+}$ <sup>66,67</sup> (Fig. 2).

En ciertas arterias y venas, el NO puede causar hiperpolarización con la consecuente dilatación de la musculatura lisa vascular por activación directa de canales de potasio, en una forma independiente de GMPc<sup>101</sup>. El NO también inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria y el crecimiento de las células del

músculo liso.<sup>3,58,110</sup> En otros sistemas, el NO posee un papel importante en la neurotransmisión<sup>10</sup> y en la respuesta inmune.<sup>78</sup>

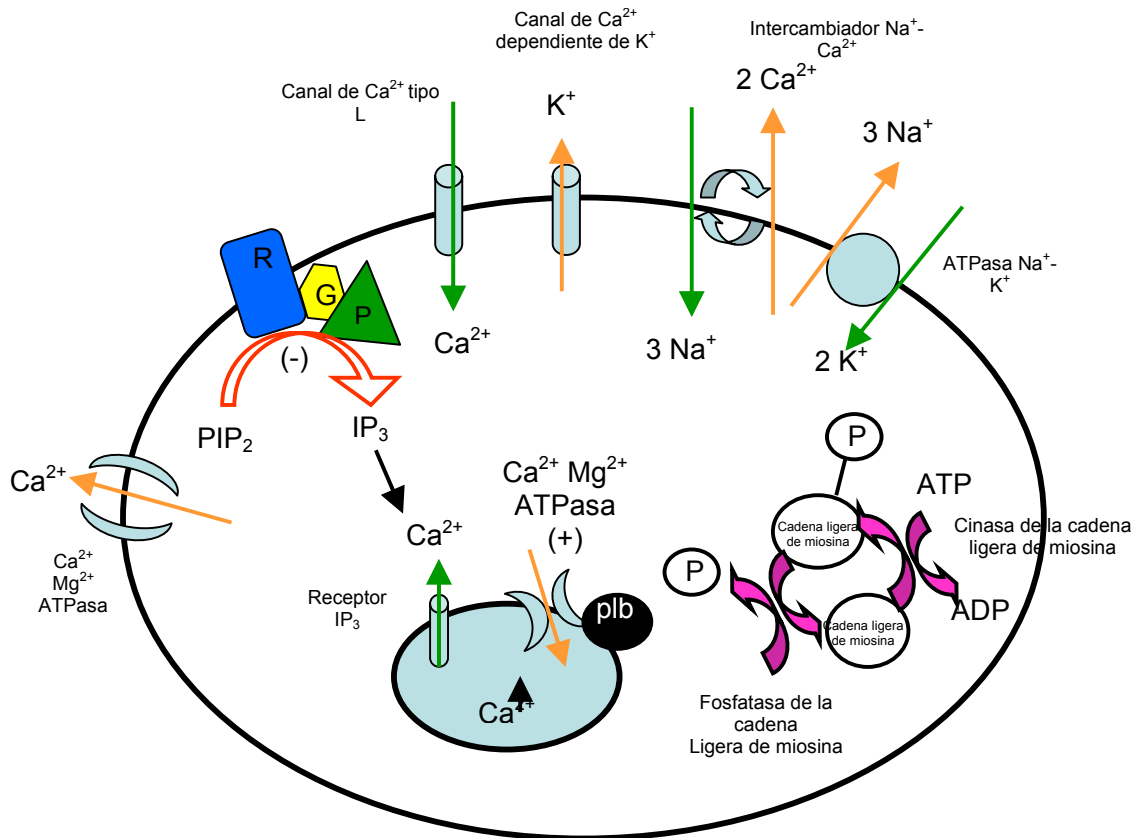


Fig. 2 Mecanismos moleculares subyacentes en la relajación del músculo liso mediado por GMPc. El GMPc induce la relajación del músculo liso reduciendo la  $[Ca^{2+}]_i$  y desensibilizando el aparato contráctil al  $Ca^{2+}$ . El GMPc reduce  $[Ca^{2+}]_i$  por inhibir el ingreso de calcio a través de los canales tipo L, incrementando la salida de  $Ca^{2+}$  a través de la activación de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  y el intercambiador de  $Ca^{2+}$  de la misma manera el GMPc produce una hiperpolarización de la membrana al activar la ATPasa  $Na^+/K^+$  y los canales de  $K^+$ , incrementado el secuestro hacia retículo sarcoplásmico de  $Ca^{2+}$  a través de la activación de la ATPasa, tras la fosforilación del fosfolambam, disminuyendo la movilización de  $Ca^{2+}$  tras la inhibición del receptor de  $IP_3$  en el retículo sarcoplásmico. R (receptor) G (proteína G), PLC (fosfolipasa C),  $IP_3R$  (receptor de  $IP_3$ ), el GMPc desensibiliza al aparato contráctil de  $Ca^{2+}$  probablemente por activar a la fosfatasa de cadena ligera de miosina que resulta en la desfosforilación de la cadena ligera de miosina.

**Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.** Es evidente que existen otros factores diferentes al NO que median vasodilatación como por ejemplo el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE). Dicho factor involucra en su acción la participación de los canales de potasio activados por calcio (fig. 1)<sup>20,36,39,43,75,76,91</sup>, los cuales provocan hiperpolarización con la consecuente vasodilatación. Los canales de potasio activados por calcio desempeñan un papel importante en la regulación del tono y en la acción del FHDE. Estos canales se han clasificado en 3 categorías. Canales de gran conductancia ( $BK_{Ca}$ ), los cuales son sensibles a la iberotoxina y desempeñan un papel importante oponiéndose a la despolarización iniciada por un estímulo vasoconstrictor. Otra categoría de estos canales lo representan los de conductancia intermedia ( $IK_{Ca}$ ), que son sensibles a la inhibición por carbidotóxina y aunque están presentes en el endotelio vascular no parecen desempeñar un papel importante en el músculo liso vascular en condiciones fisiológicas. Por último los canales de pequeña conductancia ( $SK_{Ca}$ ), dentro de los cuales se han descrito 3 subtipos (SK1, SK2 y SK3) son sensibles a la toxina apamina y parecen ser importantes en la acción del FHDE. Dentro de todos los canales mencionados, los más probables que participan en la acción de FHDE son los canales de pequeña y los de intermedia conductancia ( $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$ )<sup>14</sup>. Originalmente, al FHDE se le designó como una sustancia derivada del endotelio de naturaleza distinta a las prostaglandina y al NO que activaba canales de potasio. La razón de esta definición fue debida a que la vasodilatación coronaria inducida por la bradicinina era resistente al bloqueo por los inhibidores de la SON y de la COX. Aunque sigue siendo desconocida la identidad del FHDE, los epóxidos provenientes del ácido araquidónico

dependientes de Citocromo P<sub>450</sub> llenan los requisitos para ser considerados como tales<sup>75</sup>. Dentro de estos, los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs); como por ejemplo, los derivados 11, 12-EET representan los candidatos más probables para producir la vasodilatación coronaria independiente de NO y dependiente del citocromo P<sub>450</sub> e inducida por la bradicinina.<sup>29,91</sup> La razón de la afirmación anterior es debida a que los EETs reproducen muchos de los efectos atribuibles al FHDE. Por otro lado, estos metabolitos del ácido araquidónico y el FHDE poseen otras acciones, ya que participan en la regulación de la expresión de varios genes en la pared vascular. Los EETs pueden ser incorporados en los fosfolípidos de las membranas de las células del endotelio y del músculo liso vascular en donde permanecen durante periodos prolongados en estas células y producir efectos crónicos. De esta forma se piensa que los EETs pueden participar en la angiogenesis<sup>34</sup>. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el citocromo CYP 2C9 (sintasa de FHDE) es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno lo que junto a las acciones anteriores de los EET<sup>34</sup> contribuyen a la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad coronaria.<sup>31, 34</sup>.

Finalmente, se ha descrito que el FHDE mas que tener una acción aditiva con el NO para producir vasodilatación, este último a concentraciones mayores a las fisiológicas inhiben a las enzimas del citocromo reduciendo la producción del FHDE. Por el contrario, las bajas concentraciones de NO favorece la acción de las sintasa de FHDE provocando un incremento en la producción del vasodilatador. Estas observaciones sugieren que el FHDE puede actuar como un sistema de respaldo para mantener la vasodilatación en situaciones de disminución de NO<sup>31</sup>.



En la hipertensión arterial inducida por el Pb, se tienen evidencias de que el metal disminuye la actividad, síntesis o liberación del FHDE.<sup>85, 75</sup> Esta situación podría provocar un incremento de la participación del NO en la vasodilatación dependiente del endotelio.

**Prostacilina (PGI<sub>2</sub>).** La prostacilina es la prostaglandina vasodilatadora producida por las células endoteliales vasculares<sup>101</sup>. Es la responsable primordial de mantener la resistencia contra la agregación plaquetaria, inhibe la proliferación del músculo liso vascular, modula el recambio de colesterol y participa, junto con el NO y el FHDE provenientes del endotelio, en el control local del tono vascular produciendo vasodilatación (fig. 1)<sup>3,45</sup>. La generación de prostanoides está determinada por la movilización de ácido araquidónico de la membrana celular por acción de la fosolipasa A<sub>2</sub>. El siguiente paso en la formación de las prostaglandinas es la oxidación del ácido araquidónico, reacción catalizada por la ciclooxigenasa (COX). Existen 2 isoformas de esta enzima, una que se expresa en forma constitutiva (COX-1) en las células y otra (COX-2) que es inducida por distintas sustancias entre las que destacan las citocinas, factores de crecimiento y endotoxina; este efecto es bloqueado por los glucocorticoides.<sup>15</sup> Sustancias como la aspirina y la indometacina inhiben a la COX y evitan la formación de las prostaglandinas<sup>51</sup>. El precursor de todos los prostanoides,<sup>101</sup> la PGH<sub>2</sub>, se forma por acción de la sintasa de PGH<sub>2</sub>. A partir de ahí, puede ser convertida en distintos productos como son: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. Esta última es sintetizada por acción de la prostacilina sintetasa y es hidrolizada rápidamente para dar lugar al metabolito inactivo 6-ceto PGF<sub>1α</sub>.<sup>15</sup> La prostacilina ejerce sus efectos a través

de la activación de receptores membranales denominados IP, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G. La activación de estas conlleva a un incremento en los niveles de AMPc en las plaquetas, en el músculo liso y en el endotelio vascular. Dicho incremento de AMPc resulta en una inhibición de la agregación plaquetaria, vasodilatación (fig. 1) e influencia inactivadora en el endotelio sobre la proliferación, la permeabilidad y contractilidad celular.<sup>15</sup> Dentro de los estímulos que favorecen la formación y liberación de la PGI<sub>2</sub> se encuentran las fuerzas de fricción (*shear stress*), la presión pulsátil y distintos mediadores endógenos vasoconstrictores y vasodilatadores (fig. 1).

#### **B. Fármacos que producen relajación vascular independiente del endotelio pero dependiente de NO.**

Los nitrovasodilatadores son fármacos que causan vasodilatación en una forma independiente del endotelio y pueden ser considerados como prodrogas que contienen y liberan NO y de esta manera pueden mimetizar la actividad del NO endógeno cuando se administran a los sistemas biológicos<sup>17</sup>. Aunque es poco claro, las distintas clases de los nitrocompuestos por lo general difieren en los mecanismos de bioactivación, por ejemplo: la necesidad por los cofactores y enzimas, la dependencia del pH para la desnitratación y liberación del óxido, así como su susceptibilidad a la luz, oxígeno y temperatura.<sup>27</sup> Dependiendo de la naturaleza química del nitrocompuesto y del cofactor, las vías de la bioactivación son claramente diferentes<sup>71,77</sup>. En el caso de la nitroglicerina, y a diferencia del nitroprusiato de sodio que libera NO espontáneamente en presencia de glutatión, se transforma en forma más compleja ya que requiere de la enzima glutatión-

nitrato-orgánico reductasa. A una misma concentración de los nitrocompuestos e incluso comparando aquellos con igual número de grupos nitro, presentan importantes diferencias en la potencia para liberar NO y en la estimulación de la guanilato ciclasa soluble<sup>27</sup>. En la actualidad, contamos con diferentes clases de compuestos nitrovasodilatadores dentro de los que se encuentran los nitratos y nitritos orgánicos, los S-nitrosotioles, sydnoniminas, furoxanos, nitritos inorgánicos y el nitroprusiato de sodio<sup>27</sup> que empleamos en nuestro estudio. El perfil farmacodinámico de todos los compuestos nitrados es más o menos idéntico, mientras que la potencia de cada uno correlaciona positivamente con su liposolubilidad. Entre mayor sea el número de grupos nitrato por molécula se incrementa la lipofilidad y la penetración a través de las membranas celulares.<sup>27</sup>

### **C. Fármacos que producen relajación vascular dependiente del endotelio y dependiente de NO.**

La acetilcolina es el neurotransmisor de las sinapsis colinérgicas endógenas. Sus acciones son mediadas a través de dos tipos de receptores: Muscarínicos y nicotínicos, que traducen la señal a través de distintos mecanismos.<sup>64</sup> Los receptores muscarínicos se encuentran principalmente en las células efectoras autonómicas que son inervadas por los nervios parasimpáticos postganglionares. Además, dichos receptores están presentes en el cerebro, ganglios, y en otras células como los vasos sanguíneos, que reciben poca o nula inervación colinérgica.<sup>64</sup> El empleo de las técnicas de unión a radioligandos y de clonación revela la existencia de 5 subtipos de receptores muscarínicos,<sup>8</sup> todos interactúan con proteínas G membranales que unen nucleótidos de guanina, las cuales

regulan distintas proteínas efectoras en las células. La estimulación de los receptores  $M_1$  o  $M_3$  causa la activación de la proteína  $G_q$  lo que activa a la fosfolipasa  $C\beta$ , lo que conduce a la formación de trifosfato de inositol a partir de la hidrólisis de fosfo inositidos de membrana particularmente fosfatidil-inositol 4,5 bis fosfato membranar.<sup>108</sup> El  $IP_3$  difunde hacia el citoplasma e incrementa la concentración intracelular de calcio, el cual se une a la calmodulina formando un complejo calcio calmodulina la cual se une a la NOSe activándola y produciendo NO. Este difunde hacia las células musculares lisas produciendo vasodilatación. Por otro lado, la estimulación de los receptores  $M_2$  y  $M_4$  provocan una inhibición de la adenilato ciclasa y regulan canales iónicos específicos (por ejemplo, aumentan la conductancia a potasio en células cardíacas) por interacción con proteínas G sensibles a la toxina pertusis ( $G_i$  y  $G_o$ ).

En lo que se refiere a efecto sobre los vasos sanguíneos se puede decir que en general, la acetilcolina produce una vasodilatación en todos los lechos vasculares (fig. 1). Este efecto es debido a la presencia de los receptores muscarínicos, principalmente los subtipos  $M_1$  y  $M_3$  que se encuentran en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.<sup>83</sup> Estos receptores al ser estimulados provocan que las células endoteliales liberen factores relajantes derivados del endotelio, principalmente NO y FHDE (fig. 1).<sup>83</sup> Si el endotelio se daña, la estimulación de los receptores muscarínicos en el músculo liso vascular puede conducir a una vasoconstricción.<sup>8</sup>

## 2. INTOXICACIÓN POR PLOMO

La industrialización de los países ha traído como consecuencia el problema de la contaminación de la biosfera. Uno de los contaminantes mas antiguos que se conoce es el plomo<sup>65</sup>. Aun cuando se ha reducido importantemente en las gasolinas y en las pinturas, lo que ha provocado que disminuya en mucho la exposición a este metal, la exposición crónica al metal aún a bajos niveles continua siendo un problema. Existen múltiples fuentes de exposición al metal pesado y estas incluyen: pinturas, exposición en los ambientes de trabajo como por ejemplo en los procesos industriales que utilizan el plomo como los mineros entre otras fuentes.<sup>1,5,6,7,26,57,92,93</sup>

### A. Características de la intoxicación

La intoxicación crónica con  $Pb^{2+}$  se le conoce con el nombre de saturnismo y los órganos afectados son principalmente el sistema nervioso central, los nervios periféricos, el sistema hematopoyético, el riñón, el músculo esquelético y el tracto gastrointestinal.<sup>1,6,7,11,22,26,53,80,87,92</sup> La intoxicación es más grave en los niños porque el grado de captación del metal es mayor.<sup>18,19,60</sup> La intoxicación se caracteriza por anemia, hemólisis, daño en la síntesis de hemoglobina, cólico, neuropatías periféricas, parálisis muscular y nefropatía.<sup>40</sup> En los niños los efectos centrales son más notorios presentándose encefalopatía, retardo mental, convulsiones y parálisis cerebral.<sup>79,80</sup>

## B. Mecanismo de toxicidad de los metales pesados

Los metales pesados ejercen sus efectos tóxicos al combinarse con distintos grupos reactivos (ligandos de moléculas) que son esenciales para las funciones fisiológicas normales. Estos elementos, principalmente los de la serie de transición, reaccionan en el cuerpo con moléculas que contienen oxígeno (-OH, -COO<sup>-</sup>, -OPO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, >C=O), azufre (-SH, -S-S-), y nitrógeno (-NH<sub>2</sub>, y >NH). El complejo resultante se forma mediante un enlace de coordinación en donde se cede un par de electrones provenientes de la molécula orgánica.<sup>61</sup>

El Pb<sup>2+</sup> afecta varios sistemas enzimáticos. Por ejemplo, reduce la actividad de la  $\delta$ -amino aminolevulinato sintasa (ALA), enzima involucrada en la síntesis del grupo hemo<sup>6</sup>, disminuye también la incorporación de calcio por las mitocondrias, lo que junto con la inhibición de la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> de los eritrocitos, favorece la fragilidad de estas células. Estas acciones explican la anemia observada en la intoxicación por Pb.<sup>6</sup> Por otra parte, el Pb<sup>2+</sup> al inhibir al complejo de citocromo P<sub>450</sub> puede afectar el metabolismo de muchos fármacos y sustancias endógenas.<sup>24</sup> Se ha encontrado además que el Pb<sup>2+</sup> inhibe a la acetilcolinesterasa en los mamíferos lo que favorecería la actividad colinérgica.<sup>67</sup> Otro efecto importante observado con la administración de Pb es al nivel de la síntesis de catecolaminas. El Pb<sup>2+</sup> inhibe a la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y a la feniletanolamina-N-metiltransferasa.<sup>90,98</sup>

Además de la capacidad que tiene el Pb de afectar sistemas enzimáticos, también puede ejercer efectos debido al parecido que guarda con el ion calcio, con el cual puede competir en los sistemas biológicos en que participa este ion<sup>95</sup>. La interferencia con el Ca<sup>2+</sup> ocasionada por el Pb, también puede afectar la liberación

de catecolaminas. En el sistema cardiovascular se ha encontrado una relación entre la concentración sanguínea de  $Pb^{2+}$  y un incremento en la presión sanguínea<sup>42,47,81,89,93,94</sup> y se ha sugerido que esto puede deberse a cambios sutiles en el metabolismo del calcio, en la función renal o en el endotelio vascular.<sup>59,82</sup> Sin embargo, la influencia de la exposición con Pb sobre el aparato cardiovascular es poco clara ya que existe escasa información acerca de la toxicidad del  $Pb^{2+}$  sobre la función cardiovascular.

### **C. Plomo e hipertensión**

El plomo es uno de los venenos más antiguos, se sabe acerca de sus efectos tóxicos desde hace tres mil años<sup>65</sup> y a finales del siglo XIX se relacionan los niveles elevados de plomo en sangre con un incremento en la tensión arterial.<sup>88</sup> sin embargo con la modernización industrial y los programas de control de emisión de contaminantes, así como la introducción de gasolina libre de plomo, esta asociación se nota cada vez menos, sin embargo la exposición crónica, aún a bajos niveles de plomo se ha asociado a hipertensión arterial tanto en animales de experimentación como en humanos<sup>62, 65, 88, 99, 102, 103</sup>. De esta forma, en estudios epidemiológicos se ha encontrado evidencia que aún a niveles relativamente bajos se asocia con un incremento sostenido y significativo de la presión sanguínea.<sup>5, 48, 59, 70</sup> Se han postulados diversas teorías que intentan explicar la hipertensión asociada a plomo, entre las que destacan un incremento en la actividad simpática, decremento de receptores  $\beta$  adrenérgicos en músculo liso vascular y un incremento de estos en tejido renal,<sup>96, 105</sup> una inhibición de factores relajantes<sup>16, 72, 102</sup>, una actividad incrementada de la enzima convertidora de angiotensina y

niveles incrementados de renina, angiotensina, aldosterona, así como una actividad incrementada de la cininasa I y II<sup>105</sup>. Se ha reportado también una inhibición de la GCs en músculo liso vascular<sup>23, 72</sup> provocando un incremento de la proliferación del músculo liso vascular y la reducción de un mecanismo vasodilatador (mediado por NO),<sup>25</sup> adicionalmente se tienen evidencias que dosis bajas de plomo (0.1 a 100 ppm) producen un incremento en la producción de radicales libres<sup>23, 72, 102, 103</sup> los cuales secuestran al NO produciendo una disminución en la biodisponibilidad de este último.

#### **D. Plomo y el sistema NO/GSs**

El plomo disminuye la biodisponibilidad del NO por incrementar la producción de radicales libres los cuales secuestran al NO.<sup>102, 103</sup> En este mismo tenor se ha reportado que el tratamiento con antioxidantes previene la disminución del NO<sup>104, 102, 103, 72</sup>. Sin embargo, se ha encontrado paradójicamente un incremento en la expresión de la NOSe en etapas tempranas de la intoxicación con plomo<sup>104</sup>; esta regulación positiva también ocurre en otros modelos de hipertensión y en situaciones que involucran estrés por fricción. También es cierto que en algunos modelos de hipertensión ocurre una oxidación de la tetrahidrobiopterina a cargo de los radicales libres<sup>102</sup>, lo cual produce un desacople de la NOS que contribuye a un incremento en la producción de radicales libres, ya que al faltar la tetrahidrobiopterina o bien el sustrato L-arginina en la NOSe el flujo de electrones da como resultado la reducción del oxígeno molecular del grupo hemo en lugar de producir NO (fig. 3).



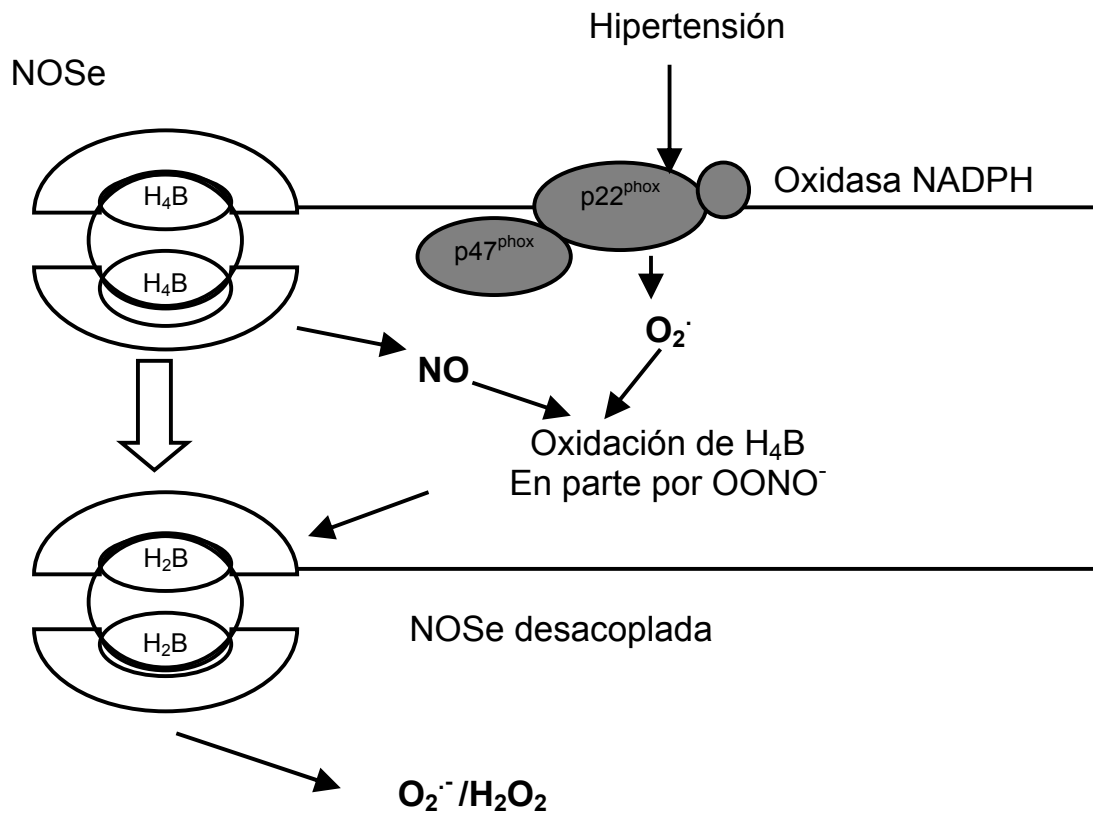


Fig. 3. Mecanismo por el cual la sintasa de NO contribuye a la formación de radicales libres al desacoplarse por oxidación de la tetrahidrobiopterina ( $H_4B$ )

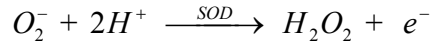
Sin embargo, no solo la síntesis del NO se ve afectada sino también su molécula blanco, la GCs, ya que los metales pesados como el plomo poseen la capacidad de inactivar a la guanilato ciclasa uniéndose al anillo de porfirina del grupo hemo y de esta manera bloqueándolo en un estado desoxi<sup>72,23</sup>. De manera adicional los radicales libres de oxígeno (ROS) al parecer tienen la capacidad de estimular un aumento en la expresión de la COX-2 el cual a su vez produce una disminución de la expresión de la GCs en la hipertensión inducida por plomo<sup>23</sup>

## E. Plomo y stress oxidativo

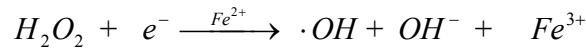
Una de las paradojas en el planeta es que la molécula que sostiene la vida aeróbica, el oxígeno, no solo es fundamental para el metabolismo energético y la respiración, si no que ha sido implicada en la patogénesis de diversas enfermedades y condiciones degenerativas.<sup>73</sup>

Se define al estrés oxidativo como el desbalance entre la generación de los ROS y el sistema natural de defensa antioxidante (fig. 4)<sup>103</sup>.

Es sabido que durante la hipertensión inducida por el plomo ocurre un incremento en la producción de radicales libres.<sup>102, 104</sup> Recientemente, se ha postulado que en la hipertensión el estrés oxidativo recae principalmente sobre la NADPH oxidasa, la cual es un pentámero conformado por las proteínas integrales gp91<sup>phox</sup> en donde se encuentra el sitio catalítico y la proteína p22<sup>phox</sup>, además de las proteínas citosólicas p47, p67 y una proteína G de bajo peso molecular.<sup>23</sup> La NADPH oxidasa se ha encontrado en la pared de los vasos. Adicionalmente y como se mencionó anteriormente, la NOS participa como una fuente de radicales libres, la cual se ha encontrado que durante la hipertensión inducida por plomo aumenta su expresión.<sup>102</sup> El estrés oxidativo, en su mayor parte, es debido a la generación de radicales hidroxilo,<sup>102</sup> tanto en animales de experimentación como en células endoteliales humanas. Cabe mencionar que los radicales hidroxilo son producidos por la reducción secuencial de superóxido a peróxido de hidrógeno, por la superóxido dismutasa (SOD) y de peróxido de hidrógeno a radicales hidroxilo libres, como se muestra en la siguientes ecuaciones:



Reacción de Fenton:



Reacción de Haber-Weiss:

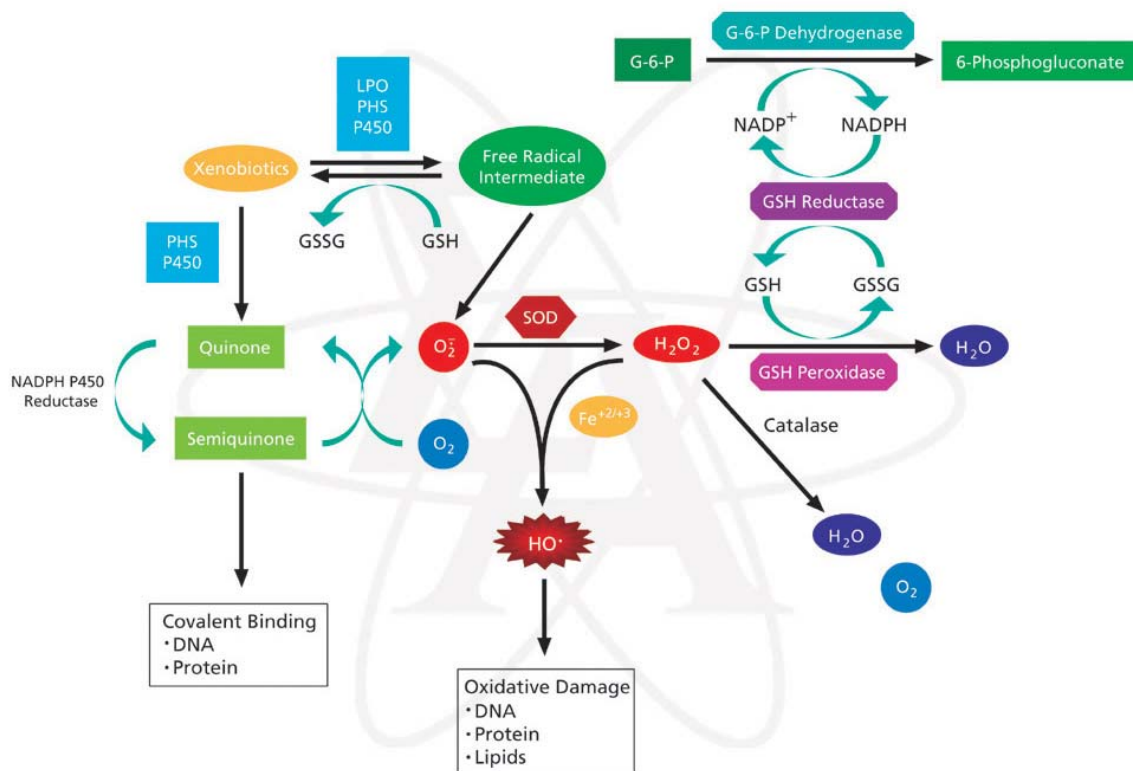
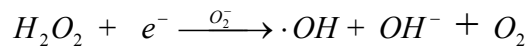


Fig 4. fuentes de stress oxidativo

De manera adicional los ROS son capaces de estimular el crecimiento de las células musculares lisas<sup>102</sup>, produciendo hipertrofia, que se observa normalmente en vasos hipertensivos. Cabe mencionar que el NO es capaz de reaccionar con el ión superóxido para formar peroxinitrito un radical libre oxidante que puede causar

fragmentación del DNA y peroxidación lipídica<sup>12, 102</sup>. En la mitocondria el peroxinitrito, actúa sobre la cadena respiratoria, en los complejos I-IV, y con la superoxido dismutasa (MnSOD) para generar aniones superóxido y peroxido de hidrogeno respectivamente<sup>12</sup> ( $H_2O_2$ ). (fig. 5)

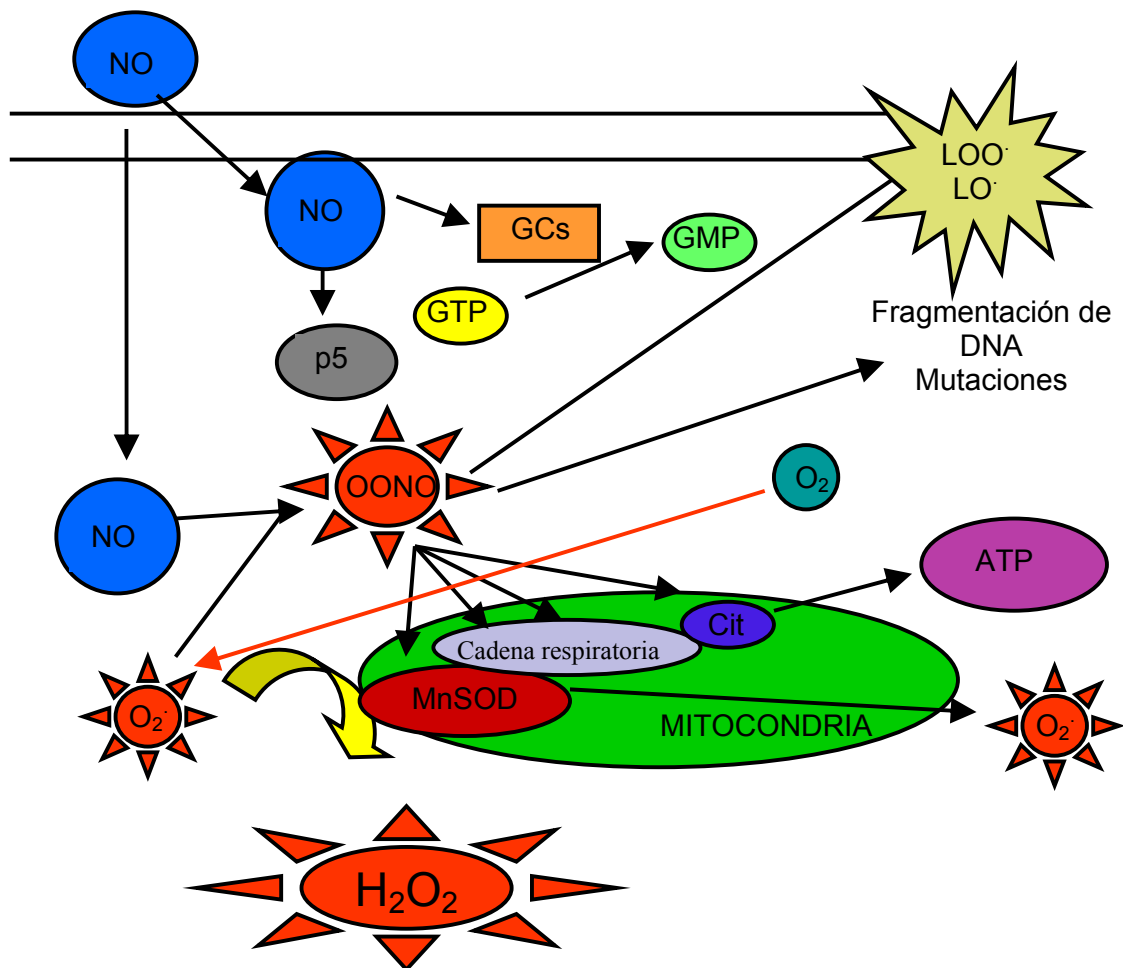


Fig. 5. Metabolismo del NO. El NO es catalizado a partir de la L-arginina por acción de la sintasa de óxido nítrico. El óxido nítrico reacciona con el hierro en el sitio activo de la guanilato ciclasa, activándola para producir el segundo mensajero GMPc el cual produce relajación del músculo liso vascular, el NO también está involucrado en la regulación de la actividad de proteínas a través de la s-nitrosilación. La toxicidad del NO está asociada con su habilidad para combinarse con aniones superóxidos ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) un radical libre oxidante que puede provocar fragmentación del DNA y peroxidación lipídica. En la mitocondria el  $ONOO^-$  actúa en la cadena respiratoria, complejos (I-IV), y en la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), para generar aniones superóxidos ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno respectivamente ( $H_2O_2$ ).

## **F. Disfunción endotelial inducida por Pb**

Existe información en la literatura que indica que el Pb produce alteraciones tanto a nivel estructural como funcional en el endotelio vascular. Dentro de las alteraciones estructurales destacan las ocasionadas al nivel de la membrana celular y el glicocalix. Así, Kaji et al (1991) indican que la exposición al Pb puede conducir a desórdenes cardiovasculares, ya que el metal disminuye el contenido de heparán-sulfato debido a una reducción de la producción de los glicosaminoglicanos en células endoteliales cultivadas.<sup>56</sup> Por otro lado, Kishimoto et al. (1995) indican que el Pb puede ser dañino para la función del endotelio como consecuencia de la inhibición de la formación de la red capilar en células endoteliales vasculares umbilicales humanas.<sup>60</sup> Desde el punto de vista histológico Kaji et al (1995) encontraron que el tratamiento con Pb (0.5 a 5  $\mu$ M) produce cambios en la forma de las células endoteliales cultivadas de la aorta de bovinos, así como una disminución en el número de células viables y una reducción en la incorporación de timidina tritiada, resultados que indican que el metal puede producir su efecto nocivo por alterar los procesos de reparación celular del endotelio vascular.<sup>54</sup> Congruente con lo anterior, Fujiwara et al. (1997) indican que en células endoteliales cultivadas de bovino, empleando concentraciones de Pb de 0.5-5  $\mu$ M se presentan alteraciones dependientes de la dosis que se traducen como una inhibición en el proceso de reparación de células dañadas. Adicionalmente, el Pb incrementa la incorporación de timidina tritiada en el músculo liso, lo que indica que la proliferación de estas células se incrementa.<sup>50</sup> Finalmente, Kaji et al (1997) sugieren que después de la exposición con cloruro de

plomo (10  $\mu$ M) las células endoteliales cultivadas poseen más núcleos de proteoglicanos de sulfato de heparan con menos cadenas de sulfato de heparan.<sup>55</sup>

Dentro de las alteraciones funcionales descritas en la literatura tenemos que la hipertensión arterial inducida por el Pb, administrado a ratas en el agua de beber (0.01 %) durante 12 meses, puede estar relacionada con alteraciones en la producción de los factores endoteliales. Así, puede presentarse un incremento en la producción de factores vasoconstrictores (como por ejemplo la endotelina) o por el contrario es posible que se produzca un descenso en los factores vasodilatadores, principalmente NO.<sup>59</sup> En apoyo a lo anterior se ha encontrado que el metal pesado inhibe al factor hiperpolarizante derivado del endotelio.<sup>85</sup>

### **3. TOXICIDAD SUBCLÍNICA.**

El término toxicidad subclínica se refiere al concepto de que la exposición a dosis relativamente bajas de ciertos compuestos químicos, el Pb entre ellos, pueden producir efectos dañinos para la salud, los cuales no se hacen evidentes en un examen clínico habitual. Se considera que la premisa fundamental para el concepto anterior es que existe una toxicidad continua en que los efectos aparentemente son asintomáticos. A estos efectos recientemente se les ha denotado como marcadores biológicos de toxicidad. De este modo, las manifestaciones clínicas obvias del envenenamiento con Pb, como por ejemplo la anemia, la insuficiencia renal, etc. caen por arriba del rango de las manifestaciones subclínicas, mientras que los efectos tales como retardo en la velocidad de conducción, daño en la biosíntesis del grupo hemo o la excreción alterada de ácido úrico se consideran dentro de las manifestaciones subclínicas.

Es importante mencionar que estos cambios subclínicos representan peligros reales y no son meramente ajustes homeostáticos o fisiológicos por la presencia de Pb.<sup>63</sup>

El reconocimiento de la toxicidad subclínica inducida por el Pb ha sido posible gracias a los avances en los laboratorios de medicina y centros de epidemiología. En los laboratorios, las pruebas bioquímicas y fisiológicas son cada vez más sensibles. Estas pruebas pueden identificar daños sutiles producidos por el Pb en alguna función como la actividad enzimática de los eritrocitos, la reactividad neurológica, y el metabolismo renal.<sup>63</sup>

## **II. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

La intoxicación por plomo es un problema frecuente en nuestro país. Sin embargo, es poco conocido el efecto que tiene sobre el aparato cardiovascular, en el cual produce hipertensión arterial. El mecanismo preciso por el cual el Pb produce la elevación de la tensión arterial no está claramente definido. Se ha sugerido que el aumento tiene que ver con una respuesta alterada del músculo liso vascular, un incremento en la producción de sustancias vasocontractiles o una afectación a nivel renal. Específicamente se tienen evidencias escasas que hablen de la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente de endotelio en el transcurso de la intoxicación por plomo. Además, se sabe poco de cómo la intoxicación por plomo afecta la expresión de las enzimas encargadas de dicha respuesta. Por la razón anterior en el presente trabajo se evaluó la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente de endotelio, particularmente se evaluó si el Pb es capaz de modificar las respuestas vasodilatadoras dependiente e independiente de endotelio inducidas por acetilcolina y nitroprusiato de sodio respectivamente en el transcurso de la intoxicación por plomo. De manera adicional se analizó la expresión de la NOSe y de la GCs en el músculo liso vascular, catalizadores importantes en la síntesis y acción del NO respectivamente, para de esta manera poder inferir una posible relación con el incremento de la tensión arterial en el transcurso de la intoxicación por plomo.



### **III. HIPOTESIS**

En el transcurso de la intoxicación crónica con plomo se produce hipertensión arterial que en parte es debida a una disminución en la producción de NO la cual puede deberse a cambios en la expresión de la NOSe y de la GCs

### **IV. OBJETIVOS**

#### **1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar si el plomo afecta la síntesis y acción del NO a través del análisis de la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente del endotelio, inducidas por acetilcolina y nitroprusiato de sodio respectivamente, y a través de la expresión de la NOSe y de la GCs.

#### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar si el plomo es capaz de modificar en anillos de aorta provenientes de ratas intoxicadas durante 10, 30 y 90 días:
  - La respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina
  - La relajación independiente de endotelio producida por nitroprusiato de sodio
  - La expresión de la NOSe y de la GCs.

## V. METODOLOGÍA

**Animales.** Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de (200-250g), las cuales se dividieron en dos grupos experimentales, (fig. 6) uno integrado por ratas tratadas con 50 ppm de acetato de plomo y otro grupo tratado con 57 ppm de acetato de sodio. El tratamiento anterior se administró a través del agua de bebida de tal forma que al final del tratamiento los animales tuvieran la misma edad. La dosis de acetato de sodio se seleccionó en base a la cantidad de acetato contenido en las 50 ppm de acetato de plomo. Cada uno de los grupos de tratamiento se subdividió a su vez en tres subgrupos, los cuales fueron tratados con el acetato de sodio o de plomo durante 10, 30 y 90 días respectivamente. A los animales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

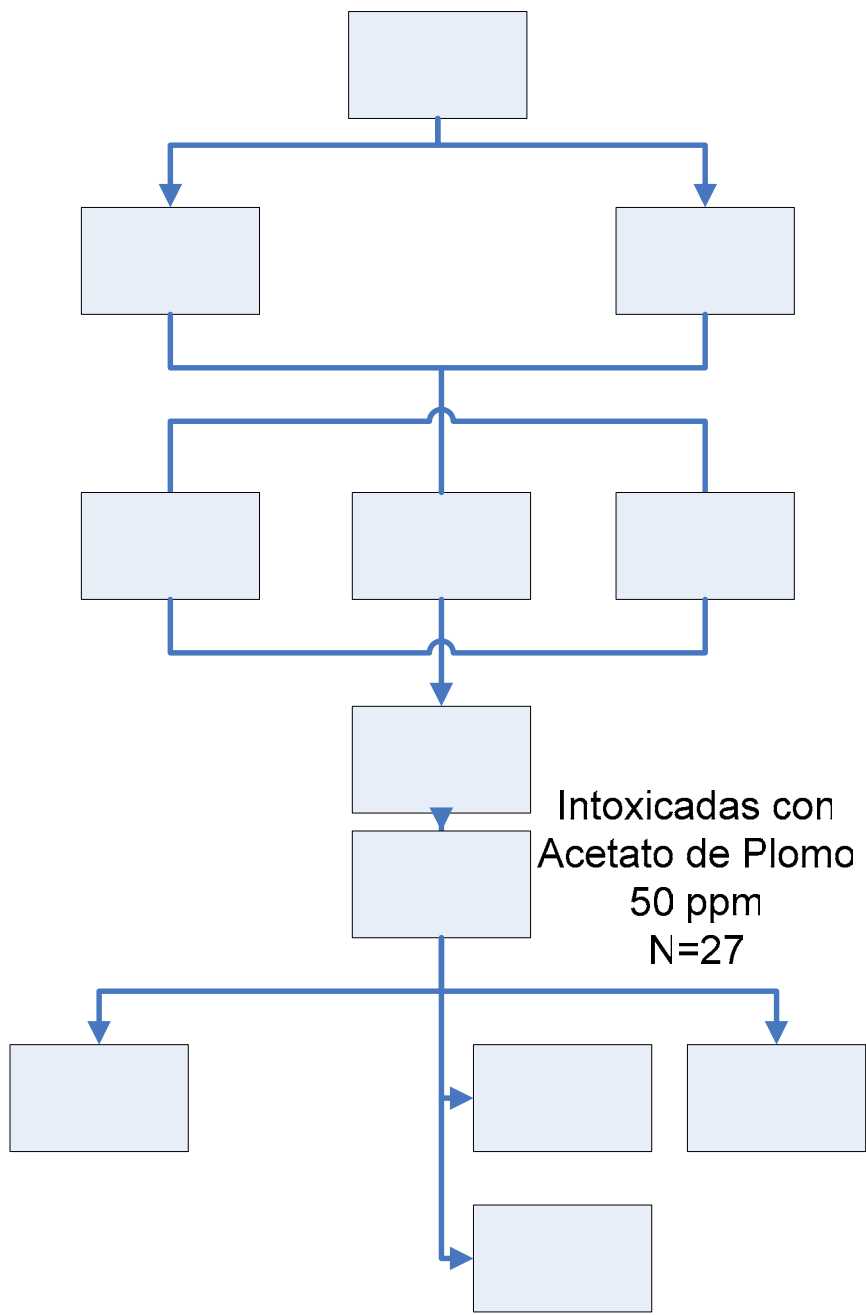
**Preparaciones in Vitro.** Una vez concluido el periodo de intoxicación, se procedió al sacrificio de los animales previa anestesia con éter mediante un golpe en la nuca. Posteriormente se cortó al animal por la parte anterior siguiendo la línea sagital, de tal forma que se expuso la aorta torácica, que una vez localizada y expuesta se extrajo del animal y se colocó en una caja de Petri que contenía solución de Krebs (de composición mM: NaCl, 118; glucosa, 11.7; HCO<sub>3</sub>Na, 25; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; EDTA-Na<sub>2</sub>Ca, 0.027; y CaCl<sub>2</sub>, 1.2) con burbujeo constante de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que a los segmentos aórticos se les retiró el tejido conectivo y graso, se cortó en segmentos anulares de 0.5 cm de largo, de tal forma que de cada rata se obtuvieran 4 segmentos. Cada anillo se montó en cámaras de vidrio para órgano aislado de 10 ml (fig. 7) llenas con solución de Krebs y burbujeadas continuamente con 95% de O<sub>2</sub> y 5%

de CO<sub>2</sub> y mantenidos a 37° C con ayuda de una bomba de recirculación. Los segmentos aórticos se suspendieron en las cámaras con la ayuda de dos ganchos de nickrom; uno de ellos se fijó al fondo de la cámara y el otro se colgó a un transductor de tensión TSD105 que, acoplado a un polígrafo MP100WSW para PC de Sistemas BIOPAC, permitió registrar en forma semiisométrica el desarrollo de tensión (fig. 8). Bajo una tensión inicial de 4 g y un período de estabilización de 2 horas se procedió a la administración de los fármacos en estudio. La integridad endotelial se evaluó en los anillos aórticos precontraídos con fenilefrina (10<sup>-6</sup> M) administrando acetilcolina (10<sup>-6</sup> M). Se consideró el endotelio vascular integro cuando se obtuvo una respuesta vasodilatadora a la acetilcolina superior al 50% (fig. 8).

## **1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **A. Evaluación de la presión arterial**

Con la ayuda de un esfigomanómetro (Letica Labs, Barcelona España), al inicio y al final del tratamiento con acetato de sodio o de plomo, se determinó la presión arterial en la cola de las ratas despiertas de manera indirecta. Para la determinación de la tensión arterial, las ratas fueron colocadas en un ambiente a temperatura a 32°C durante 10 a 15 minutos, posteriormente se colocaron en un cepo individual, se les colocó el esfigomanómetro en la cola y se infló y desinfló varias veces el manguito para que se familiarizaran y una vez que se obtuvo un grado de relajación aceptable se procedió a la toma de la tensión arterial.



Rata Mac  
Wistar (2  
N=

Fig 6. Diagrama que muestra el flujo del protocolo experimental

10 Días

30 Días

**B. Efecto del plomo sobre la relajación inducida por acetilcolina en los anillos de aorta de rata tratada durante 10, 30 o 90 días con acetato de sodio o de plomo.**

Con la finalidad de evaluar el efecto del plomo administrado durante 10, 30 o 90 días sobre la relajación dependiente del endotelio y dependiente de NO; se construyeron curvas concentración respuesta a la acetilcolina ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) en anillos precontraídos con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) provenientes de ratas tratadas con 50 ppm de acetato de plomo o 57 ppm de acetato de sodio.

**C. Efecto del plomo sobre la relajación inducida por nitroprusiato de sodio en los anillos de aorta de rata tratada durante 10, 30 o 90 días con acetato de sodio o de plomo.**

Con el objeto de evaluar el efecto del plomo administrado durante 10, 30 o 90 días sobre la relajación independiente del endotelio y dependiente de NO; se construyeron curvas concentración respuesta a nitroprusiato de sodio ( $10^{-11}$  -  $10^{-6}$  M) en anillos precontraídos con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) provenientes de ratas tratadas con 50 ppm de acetato de plomo o 57 ppm de acetato de sodio.

**D. Efecto del plomo sobre la expresión de la SONE y la GCs en los anillos de aorta de rata tratada durante 10, 30 o 90 días con acetato de sodio o de plomo.**

Para la determinación de la expresión proteica de las enzimas NOSe y GCs se realizó la técnica de Inmunoblot. Para esto se sacrificaron los animales una vez completado el periodo de intoxicación respectivo de los grupos en una cámara de

éter, se realizó una laparotomía toraco-abdominal en la línea media escindiendo la totalidad de la aorta descendente (segmento torácico y abdominal), la cual fue colocada en una solución de Tris HCl pH 7.4, 0.1 M a 4°C para la remoción de tejido conectivo y graso. Una vez limpia la aorta se dividió en sus segmentos torácico y abdominal tomando como referencia el diafragma y descartando dos segmentos de 5 mm de largo proximales y distales al mismo, ambos segmentos fueron a su vez colocados en tubos de ensayo que contenían 1 ml o 0.5 ml de Tris HCl pH 7.4, 0.1 M, así como 10µl/ml de un cóctel de inhibidores de las proteasas (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, PMSF; Nap-Tosyl-Lysine Chloro methy Ketona, TLCK; Iodoacetamida, IAA; Sigma®) a 4°C en hielo para los segmentos torácico y abdominal respectivamente. Se homogenizaron con un Tissue-Tearor-Biospec product® a 25'000 RPM, el homogenado se colocó en tubos de microcentrífuga de 500 µl y se centrifugaron a 3000 RPM a 4°C por 5 minutos, pasado este tiempo se obtuvo el sobrenadante el cual a su vez se dividió en dos partes, una para la determinación de la concentración de proteínas y otra para la realización del Inmunoblot.

La determinación de la concentración de proteínas se lleva a cabo mediante la técnica de Bradford la cual se modificó para hacer las determinaciones en placas de ELISA, por lo que las mezclas de los cuadros anteriores se realizan en placas de 96 pozos, y la lectura de la absorbancia se hace con un filtro de 595 nm.

### **Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford**

Curva estándar:

TUBO	PBS 1X ( $\mu$ l)	ALBÚMINA 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l ( $\mu$ l)	BRADFORD ( $\mu$ l)
1	160	0	40
2	150	10	40
3	140	20	40
4	120	40	40
5	100	60	40
6	80	80	40
7	60	100	40

Curva de proteínas:

PBS 1X ( $\mu$ l)	SOBRENADANTE ( $\mu$ l)	BRADFORD ( $\mu$ l)
155	5	40

Una vez hechas las lecturas se hizo una regresión lineal de la curva estándar para calcular la concentración proteica en  $\mu$ g/ $\mu$ L de las muestras utilizadas, después se calcularon los  $\mu$ L necesarios para una concentración de 70  $\mu$ g/ $\mu$ l que fue la cantidad cargada en los pozos de los geles de poliacrilamida para la electroforesis.

**Elaboración de geles de poliacrilamida.** Para la determinación de la expresión proteica fue necesario correr las muestras homogenizadas en geles de

poliacrilamida en diferentes concentraciones; para esto se usó el equipo de electroforesis MiniProtean III de BioRad. La preparación de los geles se realizó de la siguiente manera; se lavaron perfectamente los cristales, separadores y cámaras del equipo con agua y detergente. Se dejaron secar y se limpiaron con algodón y metanol, para retirar impurezas o grasa. La cámara se armó con cuidado siempre usando guantes, evitando tocar la superficie de los cristales, los cuales tuvieron separadores de 1.5 mm de grosor, se comprobó que no existieran fugas en la cámara usando para ello una piceta de agua desionizada; una vez listas las cámaras, se prepararon soluciones para el gel de corrida al 10% y 8%; y para el gel concentrador al 6% siguiendo las siguientes fórmulas:

*Gel de corrida*

	Poliacrilamida al 8%	Poliacrilamida al 10%
Agua desionizada	4.6 ml	4 ml
Acrilamida-Bis Acrilamida al 30%	2.7 ml	3.3 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.006 ml	0.004 ml



*Gel concentrador, poliacrilamida al 6%*

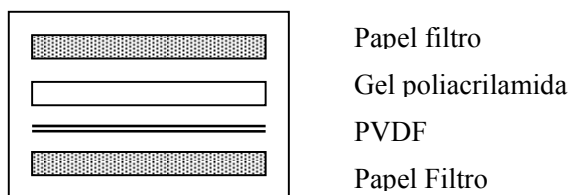
Agua desionizada	1.4 ml
Acrilamida-Bis	0.33 ml
Acrilamida al 30%	
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

Se prepara el gel de corrida, se vacía a la cámara hasta 1.5 cm antes del borde superior de las placas, el volumen total se completa con alcohol isopropílico y se nivela la cámara con un nivel de burbuja, para formar una interfaz homogénea y lineal. Se deja polimerizar durante unos 30 a 40 minutos; pasado éste tiempo se tira el isopropanol de la cámara y se enjuaga con agua desionizada, se seca con papel filtro con cuidado de no tocar el gel con el papel, una vez seco, se coloca rápidamente el gel concentrador llenando hasta el borde de las placas de vidrio y se coloca rápidamente el peine para los pozos, se limpia cualquier derrame de solución de acrilamida que se produzca. Se deja polimerizar por unos 10 a 15 minutos, al término de éste tiempo se retira el peine y los geles están listos para correrse.

Las proteínas del homogenado obtenido para el inmunoblot son desnaturalizadas en un baño a 100 °C con Buffer de carga en condiciones

reductoras (al buffer de carga se le agrega  $\beta$ -mercaptoetanol al 10%) por 10 minutos. Se cargan las muestras en el gel a una razón de 70  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y en el primer pozo se carga el marcador de PM (Kaleidoscope prestained Standards, high range, BioRad  $\text{\textcircled{R}}$ ), se colocan en un mismo gel las muestras de un mismo tejido de los controles y de las ratas tratadas con plomo por cuadruplicado. La electroforesis se corre en la cámara correspondiente usando buffer de corrida de Tris-Glicina-SDS pH 8.3, a un voltaje de 88 volts durante 1.5 a 2 horas. Una vez terminada la corrida se lleva a cabo la transferencia a una membrana de Polyvinilidene Difluoride (PVDF, Hybond-P, Amersham  $\text{\textcircled{R}}$ ), para este paso se emplea un sistema Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell de BioRad  $\text{\textcircled{R}}$ .

Es necesario colocar en la unidad de transferencia primero papel filtro prehumedecido en el buffer de transferencia, después se coloca la membrana de PVDF la cual fue prehumedecida en metanol absoluto por 10 minutos aproximadamente y después en el buffer de transferencia por 5 minutos más, una vez colocada ésta, se pone encima el gel y después otro papel filtro de tal forma que se forma un “sándwich” en la unidad de tranferencia de la siguiente manera:



Se debe procurar quitar el exceso de buffer de la unidad y cuidar el amperaje durante toda la transferencia. Es necesario usar una fuente de poder controlada por microprocesador debido a las corrientes tan altas que se usan y el bajo volumen de buffer usado. La transferencia se lleva a cabo usando aplicando

corriente de 15 volts por 45 minutos a corriente continua. Una vez terminada la transferencia se retira la membrana de PVDF en donde se transfirieron las proteínas y se sumerge a una solución bloqueadora de TBST-leche al 5% por una hora a temperatura ambiente, con la finalidad de bloquear el resto de la membrana donde no hay proteínas transferidas. Después de éste tiempo se hace un lavado con TBST sin leche por 10 minutos y se incuba con el anticuerpo primario contra SONE y GCs (anticuerpo policlonal de conejo, Santa Cruz, CA, USA ®) (anticuerpo policlonal de conejo Cayman Chemical, MI, USA) respectivamente, se emplearon membranas PLC/Ab, cada uno de estos anticuerpos se utilizan de manera independiente en cada una de las membranas) a una concentración de 1:400 en TBST-leche al 5% a 4°C en el caso de la NOSe y de 1:200 en TBST-leche al 5% para la GCs durante toda la noche en agitación continua y cuidando de tapar el recipiente donde se encuentran las membranas para evitar que se evapore el líquido durante la agitación. Al término de esto, se hicieron tres lavados con TBST sin leche por 10 minutos cada uno y se incubó con el segundo anticuerpo (anticuerpo policlonal, chivo-anticonejo-peroxidasa; Santa Cruz, CA, USA ®) disuelto en TBST-leche al 5% por 2 horas a una dilución 1:1000; pasado este tiempo se hicieron tres lavados con TBST sin leche por 10 minutos cada uno. Una vez terminado lo anterior se revela por quimioluminiscencia (Luminol, Santa Cruz, CA, USA®) exponiendo la membrana durante un minuto en 1 ml de reactivo para después exponerla a una película Hyperfilm de Amersham ® en un Casete de exposición (Spectroline ®) durante 0.5, 1 y 5 minutos, todo esto realizado en un cuarto oscuro para evitar que la película se vea, con las siguientes condiciones de revelado: Revelador 5 minutos, Agua 1 minuto, Fijador 10 minutos, Agua 10

minutos. La cuantificación de las proteínas se realizaron por medio de un método semicuantitativo densitométrico utilizando el programa Quantity One, BioRad®.

La presencia relativa de cada proteína se normalizó contra la de una proteína de referencia, la  $\beta$ -actina utilizando para esto el anticuerpo policlonal de chivo (Santa Cruz, CA, USA®) contra  $\beta$ -actina en una dilución 1: 1000 en TBST-leche al 5% por 2 horas, siguiendo el procedimiento antes descrito para el bloqueo, incubación con anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano, revelado y cuantificación densitométrica de las proteínas.

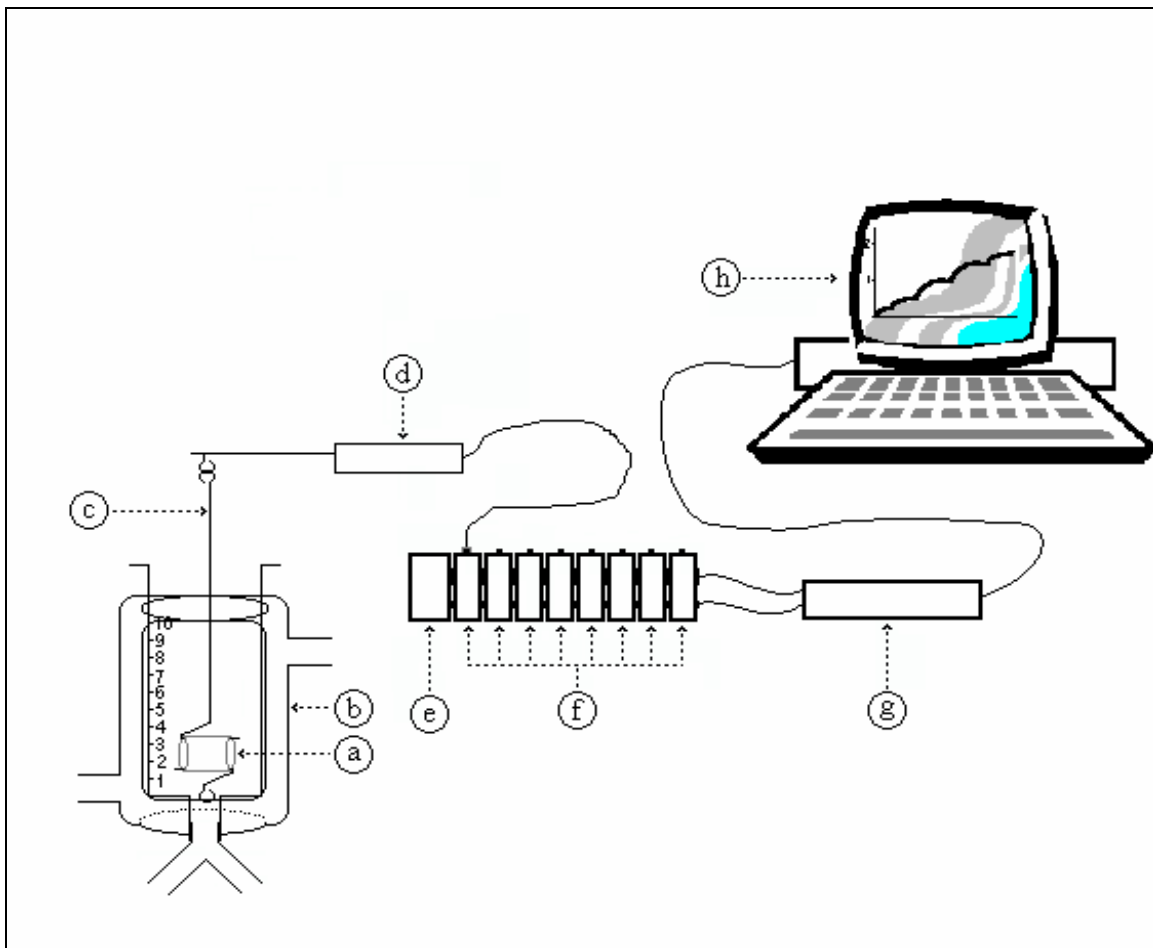
***Soluciones utilizadas:***

- Solución Homogenizadora-Tris-HCl 100 mM, pH 7.4: se disuelven 7.88 g de Tris-HCl (sigma) en 500 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1N.
- Coktail inhibidor de proteasas:
  - PMSF: se disuelven 52.3 mg en 30 ml de DMSO.
  - TLCK: se disuelven 33.23 mg en 1 ml de agua desionizada
  - IAA: se disuelven 6.6 mg en 30 ml de agua desionizada
- Solución TE con SDS: se prepara una solución de Tris-HCl 100 mM, pH 7.4 y se adiciona con EDTA 1 mM y SDS 1%. Se conserva en refrigeración.
- Solución stock de acrilamida: se disuelven 30 g de acrilamida y 0.8 g de Bis-acrilamida (N,N'-methylen-bis-acrilamida) en 50 ml de agua desionizada. Se afora a 100 ml y se almacena por 2 semanas a 2-8°C.
- Soluciones de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 y 1.5 M. pH 8.8: se disuelven

- 6 g de Tris base aforando a 100 ml y ajustando el pH a 6.8 con HCl 1 N. Almacenar a 2-8°C. Para la solución 1.5 M se disuelven 90.75 g aforando en un matraz de 500 ml y ajustando el pH de la misma manera.
- Solución de Persulfato de Amonio al 10 %: Se disuelven 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada. Se conserva en refrigeración.
- Buffer de carga para inmuno Blot: se agrega en un tubo Falcon de 50 ml los reactivos en el siguiente orden:
  1. Agua destilada 4ml
  2. Tris HCl 0.5 M, pH 6.8, 1 ml
  3. SDS 10 %, 0.8 ml
  4. 1.6 ml  $\beta$ -mercaptoetanol

se almacena en refrigeración por 2 semanas.
- Solución de TBS, pH 7.6: pesar 12.1 g de Tris base y 40 g de NaCl, ajustando el pH con HCl 1 N y aforaar a 5000 ml. Almacenar en refrigeración.
- Tween (TBST): se agrega a 100 ml de TBS, 0.1 ml de Tween 20. Esto debe hacerse con jeringa de insulina ya que es difícil pipetear el Tween.
- Buffer de corrida para inmuno Blot 10X: Se disuelven y aforan a 1 litro: 12.12 g de Tris base, 57.6 g de glicina, 4 g de SDS. Se disuelven primero en 750 ml de agua bidestilada y después se afora a 1L. No ajustar pH y almacenar a 2-8°C.
- Tris Glicina 4X:
- Buffer de transferencia:

1. Tris-Glycina HCl 10%
2. Agua desionizada 70%
3. Metanol 20%



**Fig. 7: Esquema del modelo experimental empleado para evaluar la reactividad vascular en anillos de aorta de rata.**

(a) Segmento aórtico, (b) cámara para órgano aislado de 10 ml, (c) gancho de acero inoxidable, (d) transductor de tensión BIOPAC TSD105, (e) modulo de interface universal UIM100A, (f) amplificador DA100, (g) unidad MP100WSW, (h) computadora.

## **2. FÁRMACOS UTILIZADOS.**

Todos los reactivos empleados en el caso de las preparaciones *in vitro* fueron de grado analítico. La acetilcolina, acetato de plomo y el nitroprusiato de sodio se obtuvieron de Sigma Chemical Co.; el acetato de sodio, NaCl, glucosa, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio, EDTA, cloruro de calcio y cloruro de magnesio de J.T. Baker S.A. de C.V.; Todas las soluciones se prepararon el día en que se realizó cada experimento con agua bidestilada y desionizada.

## **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

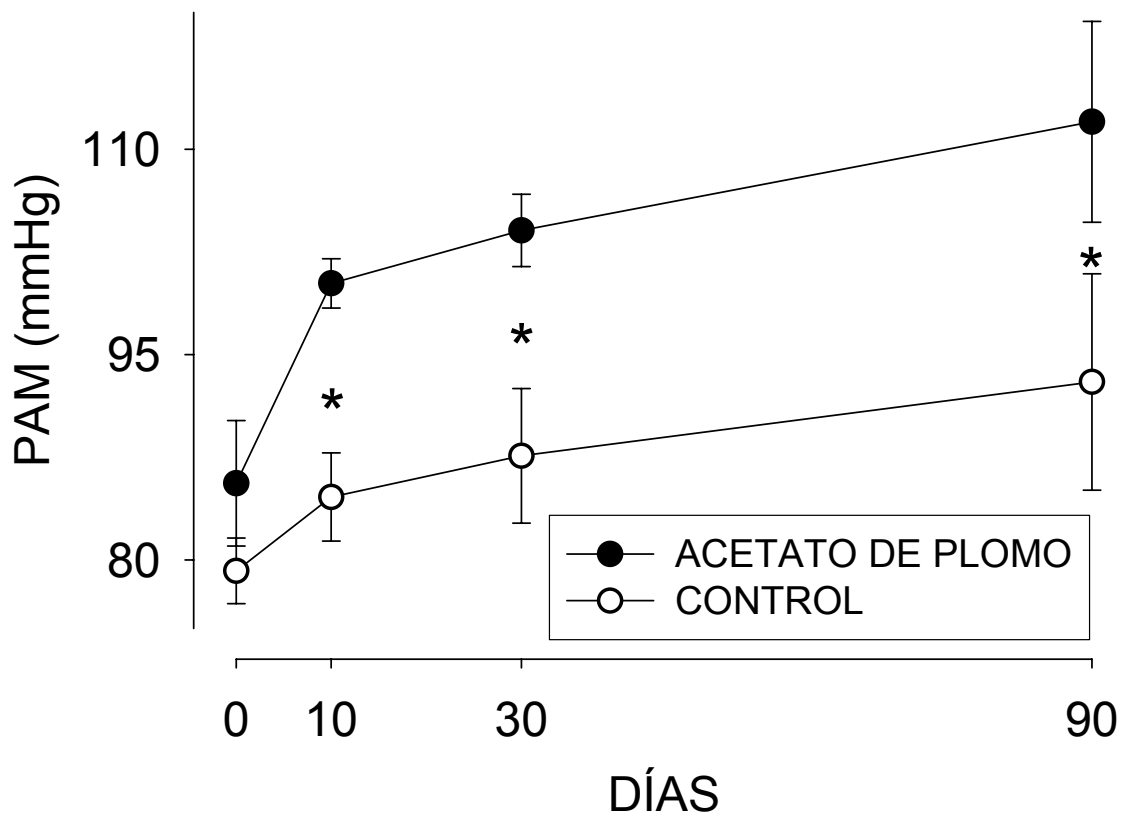
En el caso en que se evalúa el efecto relajante se expresó como porcentaje de la contracción inducida por  $10^{-6}$  M de fenilefrina  $\pm$  el error estándar. En cada serie experimental se emplearon por lo menos 6 anillos provenientes respectivamente de 6 animales. Se realizó análisis de varianza de 2 factores y prueba de Tuckey para comparaciones múltiples considerándose que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$ .

En el caso del Western Blot la expresión de las enzimas por un método densitométrico semicuantitativo, se graficaron los promedios obtenidos  $\pm$  el error estándar. En cada serie experimental se emplearon al menos 3 anillos provenientes de 3 animales diferentes. Se realizó un análisis de varianza de dos factores y prueba de Tuckey para comparaciones múltiples considerándose que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$ .

## VI.RESULTADOS

### 1. EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CON PLOMO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

En la figura 8 se muestra la grafica de la tensión arterial media de los animales en el transcurso de la intoxicación con acetato de plomo (50 ppm). Se observa en la figura que el tratamiento con plomo (50 ppm en el agua de bebida) provocó que la presión arterial media de las ratas tratadas con plomo se incrementara. Efecto del plomo evidente a partir de los 10 días de tratamiento. La PAM en el grupo control (57 ppm de acetato de sodio) muestra un incremento no significativo.

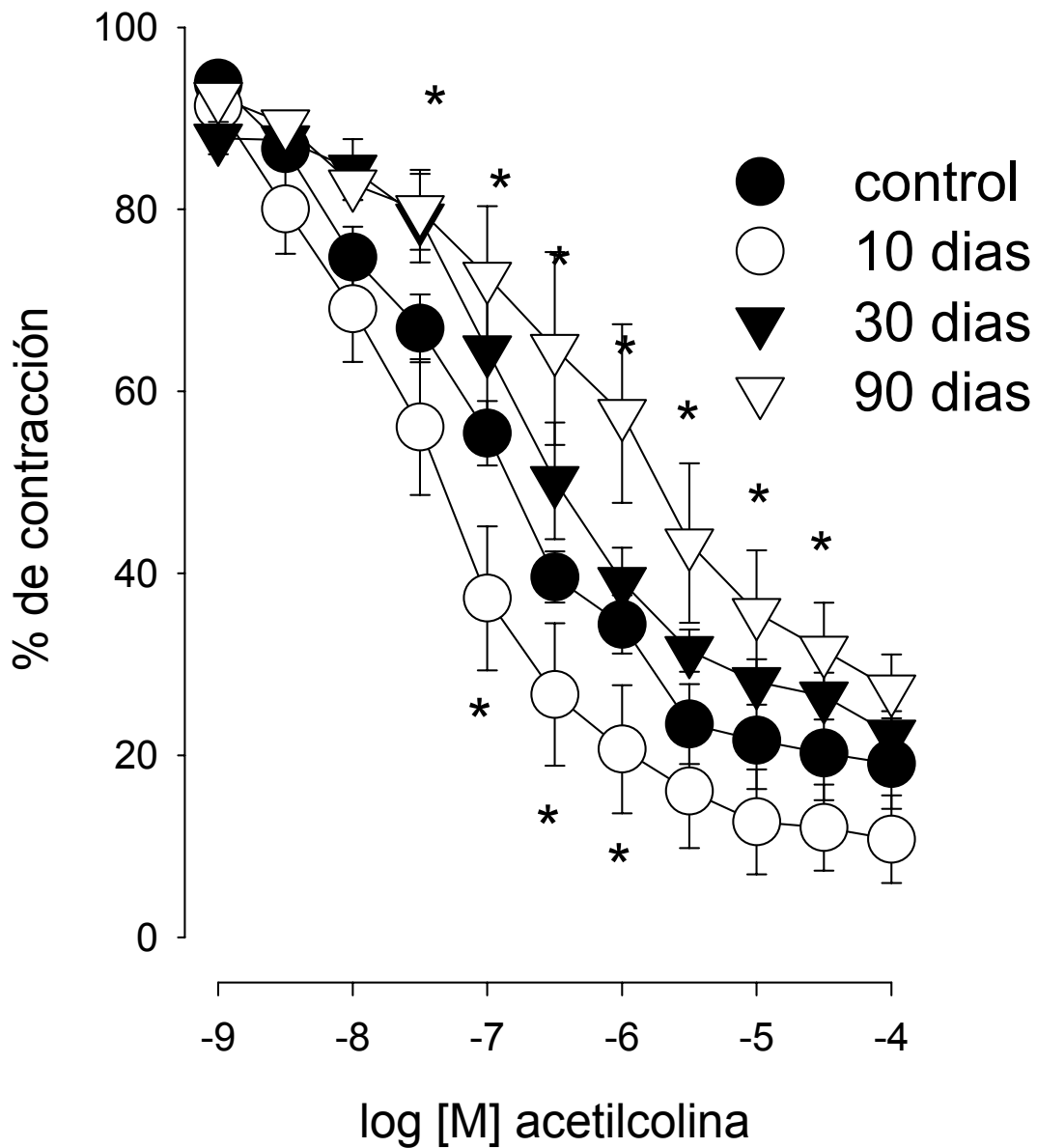


**FIG. 8** Efectos del tratamiento con acetato de plomo (50 ppm) sobre la presión arterial de las ratas en el transcurso de la intoxicación. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de por lo menos 6 experimentos. \* $p < 0.05$ .



## **2. EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO INDUCIDA POR LA ACETILCOLINA.**

En la figura 9 se muestra comparativamente las curvas concentración respuesta del efecto relajante inducido por la acetilcolina en anillos con endotelio y precontraídos con fenilefrina  $10^{-6}$  M, provenientes de ratas intoxicadas con acetato de plomo (50 ppm) o tratadas con acetato de sodio (57 ppm) durante 10, 30 y 90 días respectivamente. La acetilcolina indujo una relajación dependiente de la concentración y del endotelio. La respuesta relajante fue modificada en función de los distintos periodos de intoxicación. La relajación fue modificada en el grupo de 10 días observándose un incremento en el efecto relajante máximo, dicho efecto no se observa a los 30 días en donde no hay diferencias en la relajación inducida por acetilcolina, en el grupo de 90 días se observa que el efecto es el opuesto, apreciándose una disminución en la magnitud de la relajación inducida por acetilcolina. Se descartan que los cambios observados sean debidos a la presencia de acetato en la sal de plomo ya que en presencia de acetato de sodio la relajación inducida por la acetilcolina no se modificó.



**FIG. 9** Efecto del tratamiento con Pb (50 ppm) o acetato de sodio (57 ppm) sobre la relajación inducida por acetilcolina en preparaciones aórticas precontraídas con fenilefrina (1 $\mu$ M) de ratas tratadas durante 10, 30 y 90 días. El efecto relajante se expresa como porcentaje de la contracción a fenilefrina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de mínimo 6 experimentos \*  $p < 0.05$ .

### **3. EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA RELAJACIÓN INDEPENDIENTE DEL ENDOTELIO PRODUCIDA POR EL NITROPRUSIATO DE SODIO.**

En la figura 10 se muestra comparativamente las curvas concentración respuesta del efecto relajante producido por el nitroprusiato de sodio en anillos con endotelio y precontractados con fenilefrina  $10^{-6}$  M, provenientes de ratas intoxicadas con acetato de plomo (50 ppm) o con acetato de sodio (57 ppm) durante 10, 30 y 90 días respectivamente. El nitroprusiato de sodio produjo una relajación dependiente de la concentración. En la gráfica se aprecia que solamente en el grupo de anillos aórticos provenientes de las ratas tratadas durante 90 días la relajación inducida por el nitroprusiato de sodio fue de menor magnitud. Dicho cambio es atribuible al metal pesado y no al acetato ya que la mencionada relajación no se modificó en ninguno de los tiempos de tratamiento en la presencia de acetato de sodio.

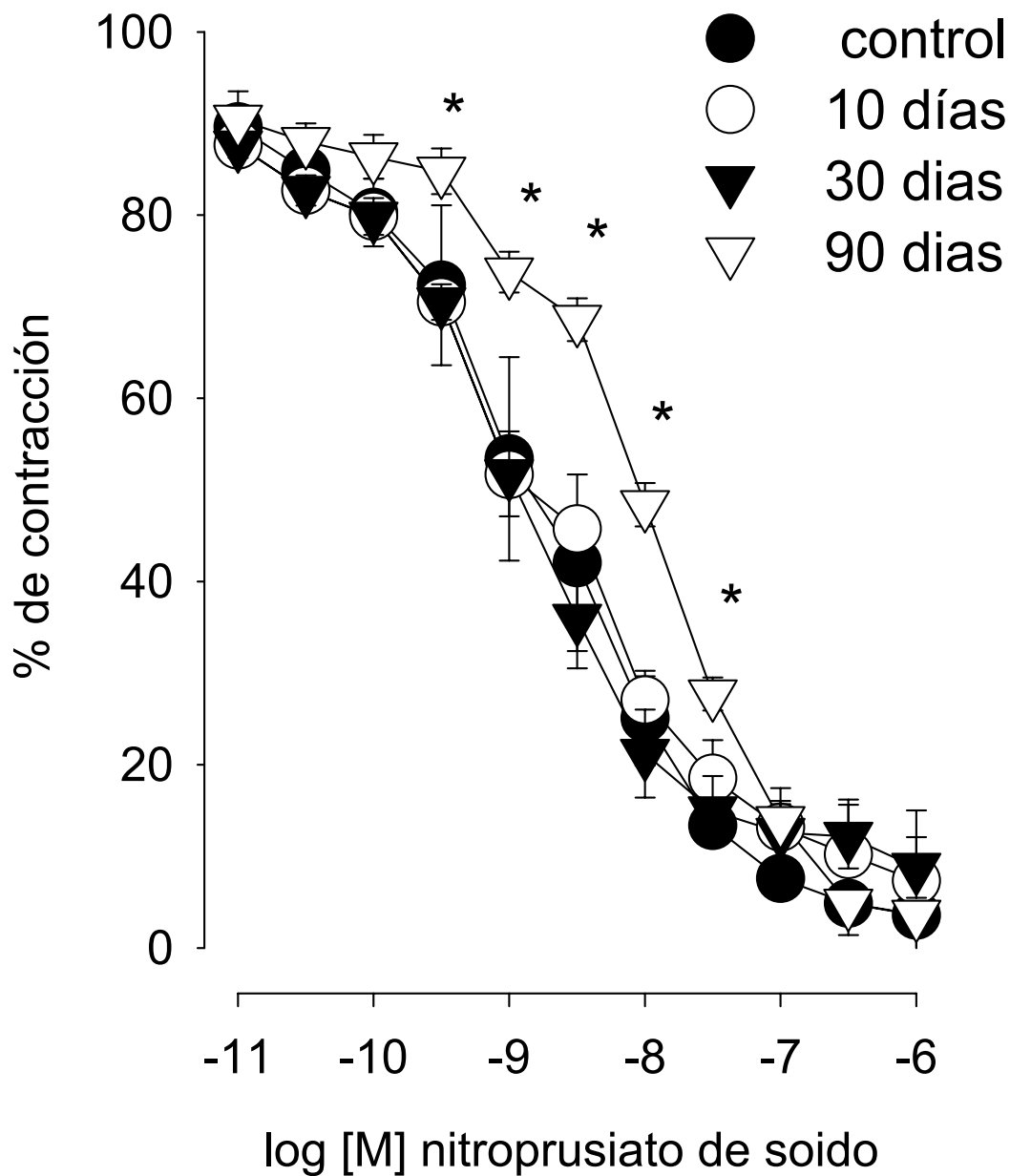


FIG. 10 EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON Pb (50 ppm) o acetato de sodio (57 ppm) sobre la relajación inducida por nitroprusiato de sodio en preparaciones aórticas precontraídas con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) de ratas tratadas durante 10, 30 y 90 días. El efecto relajante se expresa como porcentaje de la contracción a fenilefrina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de mínimo 6 experimentos \*  $p < 0.05$

#### **4. EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA NOS/GCs EN ANILLOS AÓRTICOS DE RATA EN EL TRANCURSO DE LA INTOXICACIÓN CON PLOMO.**

En la fig. 11 se aprecia el efecto del tratamiento con acetato de plomo (50 ppm) o acetato de sodio (57 ppm) administrados en el agua de bebida durante 10, 30 o 90 días; sobre la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial determinada mediante *western blot*. En la figura se observa que la expresión de la SONE se incrementa de manera importante y significativamente 2.8 veces por arriba de los valores control en el grupo de 10 días de tratamiento con plomo. Este efecto se revierte en el grupo de 30 días, de tal forma que comparados con el control no existe diferencia estadísticamente significativa. Finalmente a los 90 días de tratamiento con el metal pesado la expresión de la SONE se reduce en forma significativa (3.1 veces menos).

Por otro lado, en la fig. 12 se aprecia que la expresión de la GCs solo se afecta en forma significativa en los anillos aórticos de las ratas tratadas con el metal pesado durante 90 días de tratamiento, de tal forma que la expresión se reduce aproximadamente 4.5 veces.

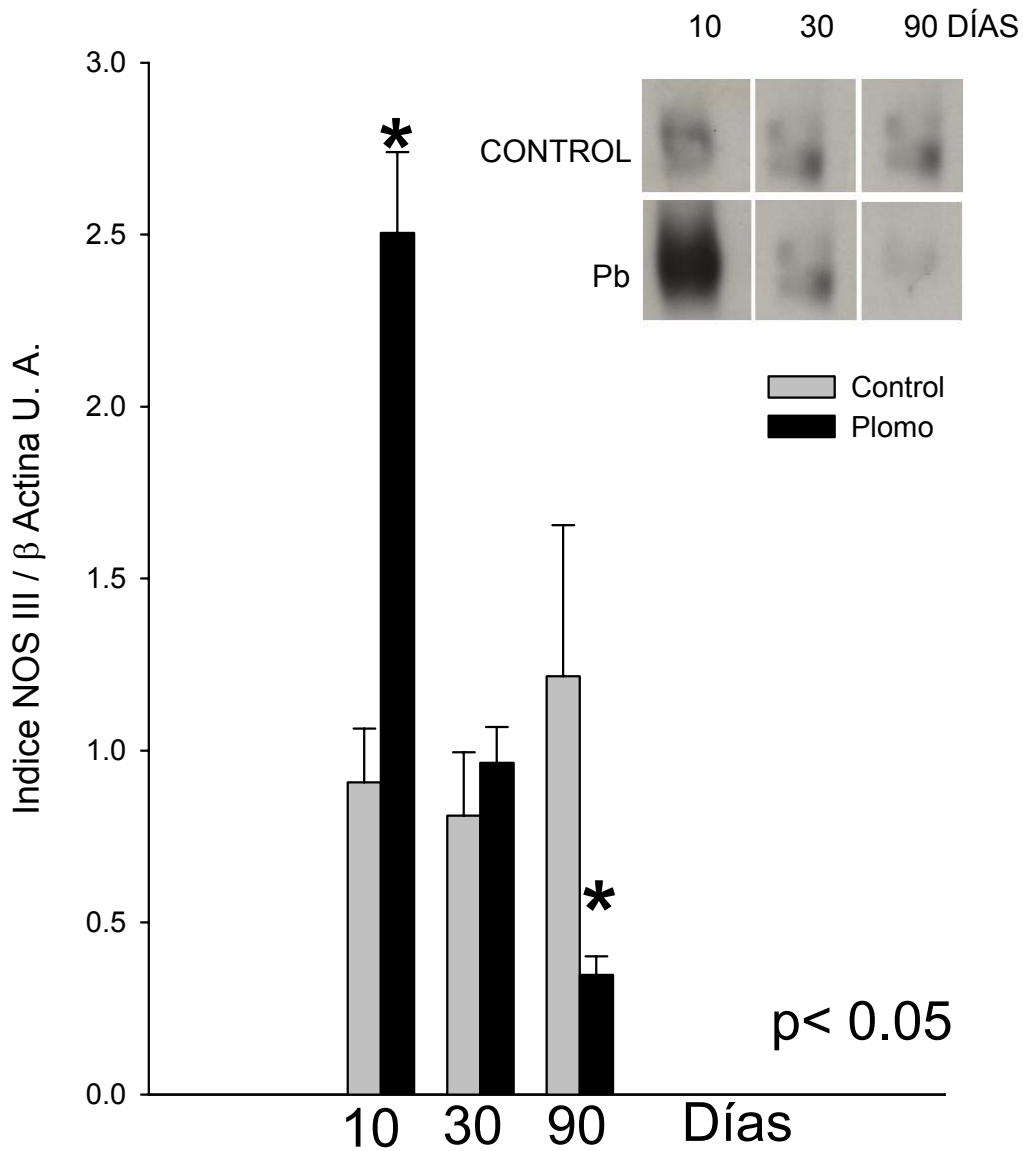


FIG. 11 Expresión de la NOS $\epsilon$  en anillos aórticos de rata intoxicada con 50 ppm de acetato de plomo o 57 ppm de acetato de sodio (control) administrados en el agua de bebida durante 10, 30 y 90 días, Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de mínimo 6 experimentos. \* $p < 0.05$ . En la figura inserta se representa un resultado típico del western blot para la NOS $\epsilon$ .

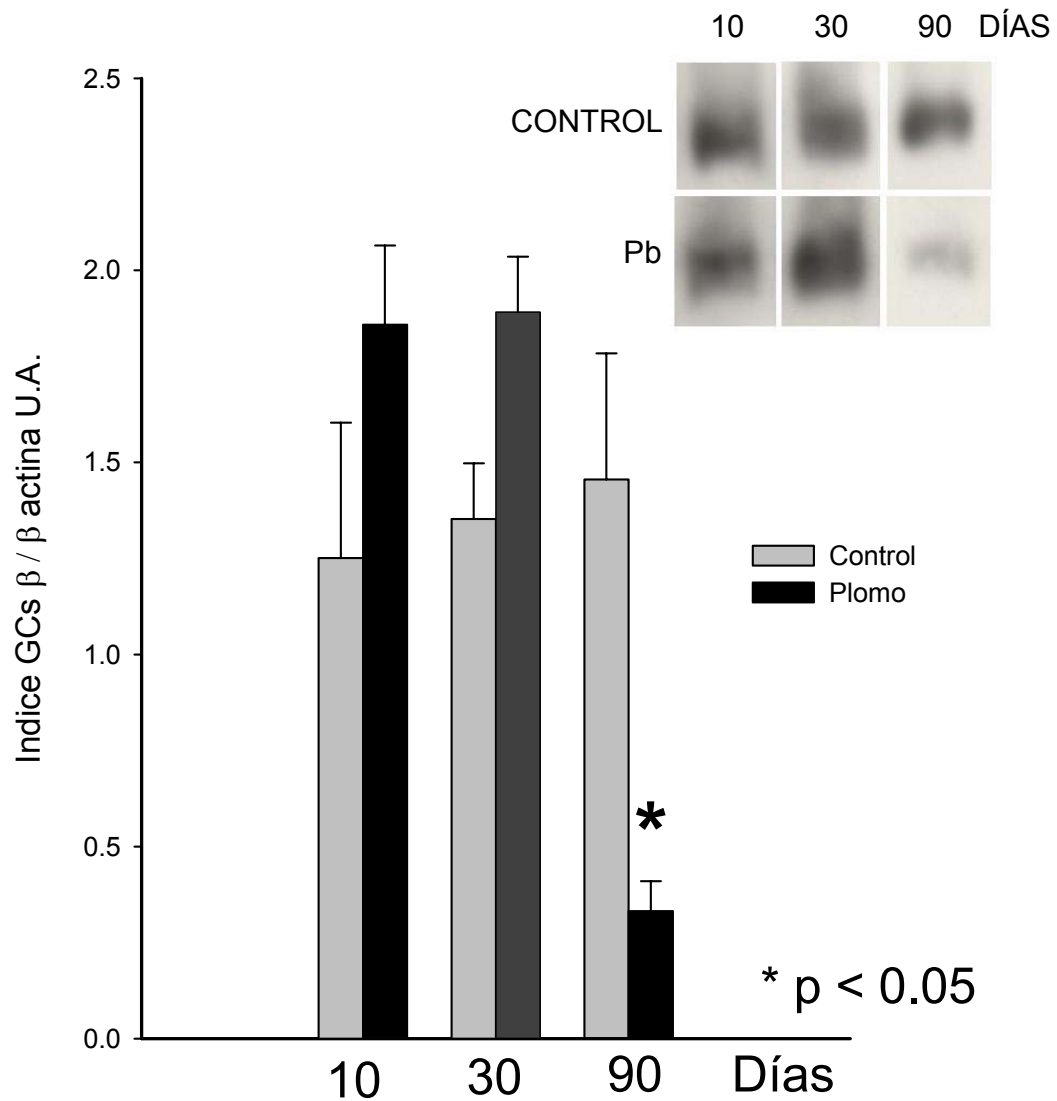


FIG. 12 Expresión de la GCs en anillos aorticos de rata intoxicada con acetato de plomo (50 ppm) y acetato de sodio (57 ppm) durante 10, 30 y 90 días, Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de mínimo 6 experimentos. \*  $p < 0.05$ . En la figura inserta se representa un resultado típico del western blot para la GCs.

## **VII. DISCUSIÓN**

En el presente estudio se demuestra que en el transcurso de la hipertensión inducida por el plomo ocurren modificaciones en la relajación dependiente e independiente del endotelio, manifestados en etapas tempranas (10 días) como un incremento en la relajación dependiente del endotelio y en etapas tardías (90 días) como en una disminución de la relajación tanto dependiente como independiente del endotelio. Estos cambios se ven acompañados de alteraciones en la expresión de la NOSe y la GCs. Ocurriendo un fenómeno de regulación ascendente de la NOSe en etapas tempranas y después de 90 días de tratamiento con plomo en un fenómeno de regulación descendente de ambas enzimas. Estos resultados sugieren que en el transcurso de la hipertensión ocurren eventos adaptativos tendientes a evitar el incremento de la presión arterial inducida por el plomo. Sin embargo, los mencionados eventos no son suficientes ya que estos no evitan el proceso hipertensivo y son superados a partir de los 30 días de intoxicación para ser revertidos a los 90 días de tratamiento con plomo.

### **1. Efecto del plomo en el transcurso de la exposición sobre la presión arterial media.**

La hipertensión inducida por plomo es uno de los aspectos del síndrome de intoxicación crónica con plomo en humanos y animales<sup>59,93</sup>. Sin embargo, existe controversia en este sentido ya que el efecto hipertensivo inducido por el plomo solo se presenta con bajos niveles de exposición (0.1 a 100 ppm administrado en el agua de bebida) en forma crónica<sup>47</sup>. Por el contrario altos niveles de exposición



(>100 ppm) parecen no correlacionar con la prevalencia de hipertensión arterial. Los resultados mostrados en la presente tesis confirman la idea de que niveles de exposición con plomo menores a las 100 ppm (50 ppm) en el agua de bebida causan hipertensión arterial (fig. 8). Sin embargo y a diferencia de los estudios de Gonick et al. (1997), en que el efecto hipertensivo se presenta a los 90 días de exposición con plomo, en el presente trabajo se presenta a partir de los 10 días. Aunque no existe evidencia relacionada para tratar de explicar estas diferencias, estas pudieran deberse a las dosis empleadas, ya que en el estudio de Gonick et al. (1997) emplearon 100 ppm en el agua de bebida y en el presente trabajo 50 ppm. Otra posible explicación pudiera ser la edad de los animales en que se inició la exposición. Se sabe que la presión arterial se incrementa como una función de la edad<sup>2</sup>. Por esta razón y para evitar el efecto del incremento de la presión arterial con la edad se diseñó un protocolo experimental tal que al final del periodo de exposición los grupos experimentales tuvieran la misma edad. Considerando este aspecto, se conoce que los efectos del plomo son menos pronunciados en adultos comparados con sujetos jóvenes o con los de edad avanzada<sup>18,19,21</sup>.

Aunque en la actualidad se desconoce el mecanismo preciso por el cual el plomo produce hipertensión, existen diversas teorías que tratan de explicar este fenómeno. Dentro de estas, destacan el incremento en la descarga del sistema renina-angiotensina-aldosterona, un incremento en la norepinefrina plasmática, un decremento en la expresión de receptores  $\beta$  adrenérgicos presentes en el músculo liso vascular, un incremento en la síntesis y liberación de factores vasocontractiles derivados de endotelio, estrés oxidativo, y una disminución en la disponibilidad de

NO debida a la inactivación de este vasodilatador por las ROS.<sup>41</sup> En este sentido se ha descrito que el incremento en la producción de ROS inducido por la exposición a bajos niveles de plomo (100 ppm) conduce a inactivación del NO e inactivación de la NOS en células endoteliales coronarias<sup>106</sup>. Por lo tanto un mecanismo posible por el cual se puede explicar el incremento de presión arterial es a través de la acción del plomo sobre la síntesis y acción del NO. Por otro lado, existen estudios limitados que describan las acciones del plomo en el transcurso de la exposición y la única evidencia se encuentra en el trabajo de Vaziri et al. (1999)<sup>102</sup> en el que muestran que en la hipertensión con plomo se presenta un fenómeno paradójico de regulación a la alta de la NOSe y de la NOSi asociada con una disminución de la excreción urinaria de nitritos y nitratos. En relación a este aspecto en el presente trabajo se analizó el efecto de la exposición con plomo (50 ppm) sobre la vasodilatación dependiente e independiente del endotelio como una medida funcional de la síntesis y acción del NO durante el transcurso de la exposición.

## **2. Efecto del plomo (50 ppm) en el transcurso de la exposición sobre la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina.**

Se construyeron curvas concentración respuesta a la acetilcolina en los anillos aórticos de ratas expuestas durante 10, 30 y 90 días con acetato de plomo (50 ppm); con la finalidad de evaluar el efecto del mismo sobre la relajación dependiente del endotelio en función del tiempo de exposición y tener una medida indirecta de la acción del metal pesado sobre la síntesis y/o acción del NO. En este sentido se conoce que la acetilcolina produce vasodilatación a través del

endotelio por estimular la síntesis y liberación, principalmente en grandes vasos, de NO<sup>83</sup>. Los resultados obtenidos se contrastaron con los respectivos grupos control en los cuales se administró acetato de sodio (57 ppm). En este trabajo se observa que existe un incremento en la relajación dependiente de endotelio producida por acetilcolina en los anillos aórticos de ratas intoxicadas con plomo durante 10 días (fig.9). Dicho incremento en la relajación dependiente del endotelio puede ser explicado por un incremento en la síntesis o acción del NO. En este sentido los estudios de Vaziri et al. (2001) demuestran en células endoteliales cultivadas que 1 ppm de plomo provoca un fenómeno de regulación ascendente en la expresión de la SONE, efecto asociado a un incremento en la producción de metabolitos de NO<sup>106</sup>, lo que sugiere que la mayor relajación a acetilcolina en este grupo es debida a un incremento en la síntesis. Sin embargo, este efecto modulador no es suficiente ya que no es capaz de revertir el proceso hipertensivo observado en los animales tratados con plomo en el mismo periodo de tiempo (fig. 8). En forma adicional y congruente con los estudios de Vaziri et al. (1999, 2001)<sup>102,103,104,106</sup> en el presente trabajo se presentó un fenómeno de regulación ascendente en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (fig. 11). Estos datos apoyan la idea de que la mayor relajación observada con acetilcolina en el grupo de 10 días pueden ser explicados por que el plomo (50 ppm) estimulan la síntesis de óxido nítrico por provocar el mencionado fenómeno de regulación ascendente de la SONE. Sin embargo, en el presente trabajo no se cuantificó el NO o sus metabolitos lo que sería deseable si se quiere ser conclusivo en este sentido. No obstante lo anterior, en el trabajo de Vaziri et al. (1999, 2001) demuestran un incremento en la producción de NOx en células

endoteliales coronarias humanas cultivadas y expuestas con 1 ppm con plomo<sup>104,106</sup> y en la orina de ratas al final del tratamiento durante 3 meses con plomo (100 ppm)<sup>102,103</sup>. Por esta razón podemos argumentar que el plomo a los 10 días de tratamiento incrementa la síntesis de NO. Sin embargo y como se mencionó anteriormente, este efecto no es suficiente para revertir el proceso hipertensivo observado en la intoxicación con plomo. Una posible explicación a esta última situación es que a pesar de que se incrementa la síntesis de NO, la mayor producción de este, así como de otros radicales libres en la intoxicación con plomo, pueden conducir a su inactivación. Recientemente mucho se ha investigado acerca del estrés oxidativo y el efecto que tiene en la hipertensión inducida por plomo. Dentro de las alteraciones que se presentan, la disminución en la biodisponibilidad del NO es a la que se le ha prestado mayor importancia, bien sea por una síntesis disminuida o por un incremento en el secuestro de este por parte de los radicales libres. En este aspecto, Vaziri et al. (1999, 2001) demuestran que existe una peroxidación lipídica incrementada en animales de experimentación debido a un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno, los cuales son capaces de reaccionar con el NO para formar peroxinitrito, y este es capaz de llevar a cabo una peroxidación lipídica y fragmentación del DNA. En los mismos estudios de Vaziri et al (1999, 2001) se demuestra que el tratamiento con agentes antioxidantes como la vitamina E revierten estos procesos así como el hipertensivo. Estos datos ponen de manifiesto un papel de los radicales libres en la hipertensión por plomo<sup>102, 103, 104, 106</sup>. Por otro lado, en este grupo de 10 días de tratamiento con plomo, la expresión de la guanilil ciclasa soluble, la cual representa el blanco de acción del NO<sup>13</sup>; se encuentra inalterada

(fig. 12) con respecto al grupo control. Lo que descarta un efecto del plomo en este grupo de animales en la acción del NO. En este sentido, se sabe que el plomo puede interferir con la función de proteínas que contienen grupo hemo en su estructura, ya que el metal inhibe la síntesis del mencionado grupo. La GCs es una enzima que contiene el grupo hemo. Por lo que resultaba razonable pensar que dicha enzima podría constituir un blanco en la intoxicación con plomo. En este sentido se ha descrito que efectivamente el plomo al interferir en la síntesis del grupo hemo reduce la síntesis de la GCs<sup>23,72</sup> Sin embargo, en el presente trabajo no ocurrió así (fig. 12) en el grupo de 10 días, ya que como se discute más adelante el efecto sobre la expresión de esta enzima parece ser dependiente del tiempo de intoxicación con plomo.

Parece interesante que, con excepción del incremento en la presión arterial (fig. 8) los hallazgos encontrados en el grupo de 10 días no se reproduzcan en el grupo de 30 días; ya que la relajación inducida por acetilcolina, así como la expresión de la SONE no mostraron diferencias estadísticamente con los valores control en este grupo. A la fecha existe información limitada para tratar de explicar esto último. En este sentido, se ha descrito que el plomo puede provocar un incremento en la formación de endotelina.<sup>107</sup> Este incremento en la formación de endotelina puede provocar, a través de la estimulación de los receptores ET-A, la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>111</sup> El peróxido se ha descrito que inhibe la expresión y actividad de la NOSe.<sup>111</sup> Esto podría explicar la reducción en la expresión de la NOSe en el grupo de 30 días a los valores control. Por último, en forma congruente con el incremento de la presión arterial observado en el grupo de 90 días, la relajación dependiente del endotelio e inducida por la acetilcolina se reduce (fig. 9). Es

probable que dicha disminución guarde relación con una reducción en la síntesis y/o acción del NO. En este sentido, tanto la expresión de la SONE como aquella de la GCs se encontraron disminuidas en ese grupo. En apoyo a lo anterior Marquez (2001) y Curtois (2003) reportaron que la subunidad  $\beta_1$  de la GCs en la intoxicación por plomo disminuía por un mecanismo no claramente establecido en el cual participaba la COX<sup>23,72</sup>. Sin embargo, las evidencias presentadas a la fecha indican un fenómeno de regulación a la alta de la SONE, resultados contradictorios en este sentido con los obtenidos en el presente trabajo en el grupo de 30 días, en el que el cambio observado a los 10 días se reduce y en el de 90 días se disminuye por abajo del control. La razón de esta discrepancia es difícil de resolver, sin embargo un argumento a favor de los resultados del presente estudio, es que es probable que en los anillos aórticos de los grupos a partir de los 30 días se lleve a cabo una destrucción de proteínas con características de oxigenasas, ya que se ha observado un incremento en la ubiquitinación de esas enzimas en la intoxicación con arsénico y es probable que también con plomo<sup>97,113</sup>. La NOS representan enzimas que tienen una función oxigenasa en el extremo N-terminal<sup>33</sup>. El incremento de la presión observado puede ser explicado, por lo tanto, por el incremento en el estrés oxidativo discutido anteriormente, por el incremento en sustancias vasoconstrictoras como la endotelina e inhibición de las vasodilatadoras como por ejemplo el FHDE y el NO entre otros mecanismos. Este aspecto, pone de manifiesto que en el transcurso de la intoxicación ocurren fenómenos adaptativos que es importante analizar para poder así entender el proceso por el cual se produce hipertensión.

### **3. Efecto del plomo (50 ppm) en el transcurso de la exposición sobre la relajación independiente del endotelio inducida por nitroprusiato de sodio.**

En el presente trabajo se valoró la actividad vasodilatadora, independiente del endotelio y dependiente de NO, inducida por el nitroprusiato de sodio como una medida de alteraciones en la acción del óxido nítrico. Los resultados muestran modificaciones inducidas por plomo (50 ppm) en la acción del óxido nítrico, manifestadas como una disminución de la vasodilatación de los anillos aórticos por el nitroprusiato de sodio, pero solo en el grupo de 90 días (fig. 10) de exposición con el metal pesado. Estos resultados se relacionan con una disminución en la expresión de la GCs, enzima que es el blanco de la acción del NO. Estos resultados guardan concordancia con el incremento en la presión arterial observada en las ratas tratadas con acetato de plomo (50 ppm) en el presente estudio (fig. 8), y son congruentes con lo reportado a la fecha en que se menciona que la hipertensión por plomo puede ser explicada por una disminución, a través de un mecanismo aún no aclarado, de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs en el cual parece participar la COX<sup>23,72</sup>; además y de manera similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo, Marquez (2001) y Curtois (2003) reportan un decremento en la respuesta vasodilatadora independiente del endotelio producida por nitroprusiato de sodio<sup>23,72</sup>. No obstante lo anterior, en esos trabajos no se analiza los cambios que ocurren en el transcurso de la intoxicación con plomo y reflejan una alteración puntual en el proceso que conlleva a la hipertensión inducida por el metal.

En resumen; el plomo provoca elevación de la tensión arterial a partir de los 10 días de exposición y desencadena cambios que se presentan como una función del tiempo de exposición y que se manifiestan en etapas tempranas (10 días de intoxicación) como un fenómeno de regulación ascendente de la SONE y una mayor relajación de la acetilcolina en ese grupo experimental, fenómeno que aunque no suficiente para revertir el incremento de la presión arterial tiende a evitarlo; y en etapas intermedias (30 días de exposición) se presentan fenómenos tendientes a revertir el fenómeno observado a los 10 días, de tal forma que esos no se observan a los 30 días de exposición con plomo y probablemente participan en el incremento de la presión arterial; para finalmente desencadenar cambios tendientes a inhibir un sistema vasodilatador que consisten en reducir la síntesis y acción del NO y que se manifiesta por hipertensión, reducción de la expresión de la SONE y de la GCs y menor relajación a los agentes vasodilatadores dependientes e independientes del endotelio.

## **VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Aunque ya ha sido descrito el papel de los radicales en la hipertensión por plomo, aún quedan muchos aspectos por resolver. Por ejemplo, aún no está descrito cuales son los daños ocasionados por los radicales libres durante el transcurso de su producción que llevan a distintas patologías como la hipertensión en este caso por plomo. Además, en etapas tempranas parecen desencadenarse mecanismos compensadores que evitan el desarrollo de la presión arterial. Aunque en etapas tardías se inhibe un mecanismo vasodilatador que explica la prevalencia de



hipertensión, aún no está claro la razón por la que la presión arterial se eleva en la hipertensión por plomo. Por último, aún se mantiene la paradoja de que el plomo produce hipertensión a bajos niveles pero no a niveles altos de exposición.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. El plomo produce un incremento de la presión arterial.
2. El plomo produce un incremento en la relajación dependiente de endotelio inducida por la acetilcolina a los 10 días de intoxicación.
3. Este aumento de la relajación parece ser debido a un incremento en la expresión de la NOSe, en este grupo.
4. La intoxicación con plomo no modificó el efecto relajante dependiente e independiente del endotelio a los 30 días de intoxicación.
5. A los 30 días de exposición al plomo parece presentarse un fenómeno de tolerancia a sus efectos sobre la respuesta vasodilatadora a la ACh.
6. El plomo produce una disminución en la relajación dependiente e independiente de endotelio inducida por la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio respectivamente en el grupo de 90 días.
7. El menor efecto relajante dependiente de endotelio, en el grupo de 90 días, parece deberse a una disminución de la expresión de la NOSe y de la GCs.
8. La menor expresión de la GCs en ese mismo grupo pudiera explicar la menor relajación inducida por nitroprusiato de sodio.
9. Los efectos inducidos por el plomo en etapas tempranas (10 y 30 días de exposición) no explican el fenómeno hipertensivo observado en la

intoxicación y los resultados obtenidos a los 90 días de exposición con plomo son congruentes con los valores incrementados de presión arterial.

10. La reducción en la expresión tanto de la NOSe como de la GCs en el grupo de 90 días parecen participar manteniendo la hipertensión inducida por el plomo.

## **X. BIBLIOGRAFIA.**

1. Baker, E.L.; Goyer, R.A.; Fowler, B.A. Khettry, U.; Bernard, O.B.; Adler, S.; White, R.; Babyor, R.; and Feldman, R.G. (1980). Occupational lead exposure, nephropathy and renal cancer. *Am. J. Industr. Med.*, 1: 139-148.
2. Barton, M. (2005). Ageing as a determinant of renal and vascular disease: role of endothelial factors. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20<.485-490.
3. Bassenge, E. (1996). Endothelial function in different organs. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 39 (3): 209-228.
4. Beevers D. G. (1980) Blood Lead and cadmium in human hypertension, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* 3:251-260
5. Beevers, D.G., Erskine, E., Robertson, M., Beattie, A.D., Campbell, B.C., Goldberg, A., Moore, M.R., and Hawthorne, V.M. (1976). Blood-lead and hypertension. *Lancet* 2 :1-3.
6. Berk, P.D.; Tschudy, D.P.; Shepley, L.A.; Waggoner, J.G.; and Berlin, N.I. (1970). Hematological and biochemical studies in a case of lead poisoning. *Am. J. Med.* 48: 137.
7. Bernard, B.P.; and Becker, C.E. (1988). Environmental lead exposure and the kidney. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 26: 1-34.
8. Birdsall, N. J. M.; Buckley, N. J.; Caufield, M. P.; Hammer, R.; Kilbinger, H. J.; Lambrecht, G.; Mutschler, E.; Nathanson, N. M.; and Schwarz, R. D. (1998), Muscarinic Acetylcholine receptors. In the IUPHAR compendium of receptor

- characterization and classification (Godfrain, T.; Vanhoutte, P. M.; Ruffolo, R. R. and Humphrey, P. P. A. editors), London, UK, pp. 36-45
9. Boulpaep L. E. (2005). Organization of the cardiovascular system. In Medical Physiology, Boron F. W., Boulpaep L. E., Elsevier Saunders; Updated Edition. PHI, US. pp 423-446
  10. Bredt, D.S. and Synder, S.H. (1992). Nitric oxide: A novel neural messenger. *Neuron* 8 (1-20): 8-11.
  11. Bressler, J.P. and Goldstein, G.W. (1991). Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 41 (4): 479-484.
  12. Brown, G.C., Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1411, 351-369 (1999).
  13. Buechler WA, Nakane M, Murad F: (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174(1):351-357.
  14. Busse R (2002) EDHF: bringing the concepts together, *Trends Pharmacol Sci.* Aug;23(8):374-80.
  15. Campbell, W.B.; and Halushka, P.V. (1996). Lipid-derived autacoids. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of therapeutics*. Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; and Goodman-Gilman, A. Eds. 9<sup>th</sup> edition, Mc. Graw Hill, NY, USA, pp 601-616.

16. Carmignani (2000). Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment, *Life Sciences*, 68:401-415
17. Castillo, C.; and Hong, E. (1991). Fármacos vasodilatadores que actúan estimulando a la guanilato ciclasa. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 61: 375-384.
18. Chisolm, J.J. (1973). Management of increased lead absorption and lead poisoning in children. *N. Engl. J. Med.* 289: 1016-1018.
19. Chisolm, J.J. and Bartrop, D. (1979). Recognition and management of children with increased lead absorption. *Arch. Dis. Child.* 54: 249-262.
20. Cohen, R.A. (1995). The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovascu. Dis.* 38 (2): 105-128.
21. Cory-Slechta D.A. (1990). Lead exposure during advanced age: alterations in kinetics and biochemical effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104:67-78.
22. Craswell, P.W. (1987). Chronic lead nephropathy. *Annu. Rev. Med.* 38: 169-173.
23. Curtois E (2003) Lead-Induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase -2; *J Am Soc Nephrol*, 14:1464-1470  
  
cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 351–357

24. Degawa, M.; Arai, H.; Kubota, M.; and Hashimoto, Y. (1994). Ionic lead, a unique metal ion as an inhibitor for cytochrome P450<sub>1A2</sub> expression in the rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200 (2): 1086-1092.
25. Dorman R. V. (2002) Lead-dependent effects on arachidonic acid accumulation and the proliferation of vascular smooth muscle, *J. Biochem Mol. Toxicol* 16 (5):245-253
26. Emmerson, B.T. (1963). Chronic lead neuropathy: the diagnostic use of calcium EDTA and the association with gout. *Aust. Ann. Med.* 12: 310-324.
27. Feelisch, M. (1993). Biotransformation to nitric oxide of organic nitrates in comparison to other nitrovasodilators. *Eur. Heart J.* 14 (Suppl 1): 123-132.
28. Feletou M, Busse R, Edwards G, Fleming I, Weston AH, Vanhoutte PM. (2003). Communication between endothelial and smooth muscle cells. *Med Sci (Paris)*.Dec;19(12):1242-50.
29. Feletou, M. and Vanhoutte, P.M. (1996). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23 (12): 1082-1090.
30. Ferrero R (2002). Prolonged exposure of chromaffin cells to nitric oxide down-regulates the activity of soluble guanylyl cyclase and corresponding mRNA and protein levels, *Biochemistry* 3-26
31. Fichtlscherer S. (2004) Inhibition of Cytochrome P450 2 C9 Improves Endothelium-Dependent, nitric oxide-mediated vasodilatation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 109: 178-183

32. Fleming I, Busse R. (1999) NO: the primary EDRF. *J. Mol. Cell. Cardiol* 31: 5-14
33. Fleming I., Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R1-R12
34. Fleming I., Busse R., (2001) Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure, *Nephrol Dial Transplant* 16: 1309-1311
35. Förstermann, U.; Pollock, J.S.; Schmidt, H.H.H.; Heller, M.; and Murad, F. (1993). Isoforms of nitric oxide synthase: Functions in the cardiovascular system. *Eur. Heart J.* 14 (suppl. 1): 10-15.
36. Furchgott, R.F and Vanhotte, P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contractil factors. *FASEB J.* 3:2007-2018.
37. Furchgott, R.F. (1988). Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: Basis for the proposal that the acid-activatable component of the inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide, in Vanhoutte, P.M. (editor): *Mechanisms of Vasodilatation*. New York, Raven Press, Publisers, pp 401-419.
38. Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)* 288:373-376.

39. Garland, C.J.; Plane, F.; Kemp, B.K.; and Cocks, T.M. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.* 16 (1): 23-30.
40. Goldstein, B., Gibson, J., Henderson, R., Hobbie, J., Landrigan, P.J., Mattison, D., Perera, F., Silbergeld, E., and Wogan, G. (1987). Biological markers in environmental health research. *Environ. Health. Perspect.* 74: 3-9.
41. Gonicck, H.C., Ding, Y., Bondy, S.C., Ni, Z., Vaziri, N.D. (1997). Lead-induced hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension* 30:1487-1492.
42. Granadillo, V.A.; Tahán, J.E.; Salgado, O.; Elejalde, L.E.; Rodríguez-Iturbe, B.; Romero, G.B.; and Romero, R.A. (1995). The influence of the blood levels of lead, aluminum and vanadium upon the arterial hypertension. *Clin. Chim. Acta* 233 : 47-59
43. Griendling, K.K.; and Alexander, R.W. (1996). Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* 10: 283-292.
44. Gross S. S., (2000). Tetrahydrobiopterin: An Essential Cofactor of nitric oxide synthase with an elusive role. In *Nitric Oxide*; Ignarro L. J. Academic Press Cal, U. S. pp 167-186
45. Gryglewski, R.J. (1995). Interaction between endothelial mediators. *Pharmacol. Toxicol.* 77 (1): 1-9.
46. Guyton, A.C.; and Hall, J.E. (1996). *Textbook of Medical Physiology*. 9<sup>th</sup> Edition, W. B. Saunders Co., USA.



47. Harlan, W.R. Landis, J.R., Schmouder, R.L., Goldstein, N.G., and Harlan, L.C. (1985). Blood lead and blood pressure. Relationship in the adolescent and adult US population. *JAMA* 253 : 530-534.
48. Hense H. W. (1993) The association of blood lead and blood pressure in population surveys; *Epidemiology* 4(2): 173-179
49. Hertz-Piccioto, I. and Croft, J. (1993). Review of the relation between blood lead and blood pressure. *Epidemiol. Rev.* 15 (2): 352-373.
50. Ignarro, L.J.; Byrns, R.E.; and Wood, K.S. (1988). Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical, in Vanhoutte, P.M. (editor): *Mechanisms of Vasodilatation*. New York, Raven Press, Publishers, pp 427-435.
51. Insel, P.A. (1996). Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of therapeutics*. Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; and Goodman-Gilman, A. Eds. 9<sup>th</sup> edition, Mc. Graw Hill, NY, USA, pp 601-616.
52. Irani, K. (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ. Res.* 87:179–183.
53. Janin, Y.; Couinaud, C.; Stone, A.; and Wise, L. (1985). The "lead induced colic" syndrome in lead intoxication. *Surg. Annu.* 17: 287-307.

54. Kaji, T.; Fujiwara, Y.; Hoshino, M.; Yamamoto, C.; Sakamoto, M and Kozuka, H. (1995). Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicol.* 95 (1-3): 87-92.
55. Kaji, T.; Ohkawara, S.; Nakajima, M.; Yamamoto, C.; Fujiwara, Y.; Miyajima, S and Koizumi, F. (1997). Lead-induced alteration of heparan sulfate proteoglycans in cultured vascular endothelial cells. *Toxicol.* 118 (1): 1-10.
56. Kaji, T.; Yamamoto, C.; and Sakamoto, M. (1991). Effect of lead on the glycosaminoglycans metabolism of bovine aortic endothelial cells in culture. *Toxicol.* 68 (3): 249-257.
57. Kazantzis, G. (1986). Lead: sources, exposure and possible carcinogenicity. *IARC Sci. Publ.* 71: 103-111.
58. Kelly, R. A., Balligand, J-L and Smith, T.W. (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.* 79:363-380.
59. Khalil-Manesh F.; Gonick, H.C.; Weiler, E.W.; Prins, B.; Weber M.A.; and Purdy, R.E. (1993). Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am. J. Hypertens.* 6 (9): 723-729.
60. Kishimoto, T.; Oguri, T.; Ueda, D.; and Tada, M. (1995). Effect of lead on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Arch. Toxicol.* 69 (10): 718-721.
61. Klaassen, C.D. (1996). Heavy metals and heavy-metals antagonists. In *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics.* Hardman,

- J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; and Goodman-Gilman, A. Eds. 9<sup>th</sup> edition, Mc. Graw Hill, NY, USA, pp 1649-1671.
62. Kopp J. S. (1988) Cardiovascular actions of lead and relationships to hypertension: a review, *Environmental Health perspectives* 78:91-98
63. Landrigan, P.J. (1990). Current issues in the epidemiology and toxicology of occupational exposure to lead. *Environ. Health. Perspect.* 89: 61-66.
64. Lefkowitz, R. J.; Brian B.; et al, (1996) Neurotransmission. The autonomic and somatic motor nervous systems. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of therapeutics*. Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; and Goodman-Gilman A. Eds. 9<sup>th</sup> ed. Mc Graw Hill, NY, USA, pp267-293.
65. Lidsky T. I. (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates, *Brain* 126:5-19
66. Lincoln T. M. (2000). Cyclic GMP-Mediated Signaling Mechanisms in smooth muscle. In *Nitric Oxide*; Ignarro L. J. Academic Press Cal, U. S. pp 401-428
67. Lucas A. K. (2000). Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375-413
68. Luo, A.D.; and Berman, H.A. (1997). The influence of Pb<sup>2+</sup> on expression of acetylcholinesterase and the acetylcholine receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145 (2): 237-245.
69. Luscher, T.F.; and Barton, M. (1997), *Biology of the endothelium*. *Clin. Cardiol.* 20 (11 Suppl 2): II-II310.

70. Maheswaran R. (1993). Blood pressure and industrial lead exposure *Am J Epidemiol* 137: 645-53
71. Maragos, C.M.; Morley, D.; Wink, D.A.; Dunams, T.M.; Saavedra, J.E.; Hoffman, A.; Bove, A.A.; Isaac, L.; Hrabie, J.A.; and Keefer, L.K. (1991). Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J. Med. Chem.* 34 (11): 3242-3247.
72. Marquez M (2001) Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats, *J Am Soc Nephrol* 12:2594-2600
73. Marx, J. L. (1985). Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 235:529-531
74. McHugh, J.; and Cheek, D.J. (1998). Nitric oxide and regulation of vascular tone: pharmacological and physiological considerations. *Am. J. Crit. Care* 7(2): 131-140.
75. Mombouli, J.V.; and Vanhoutte, P.M. (1997). Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Trends Pharmacol. Sci.* 18 (7): 252-256.
76. Mombouli, J.V.; Bissiriou, I.; Agboton, V.; and Vanhoutte, P.M. (1996). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a key mediator of the vasodilator action of bradikinin. *Immunopharmacology* 33 (1-3): 46-50.
77. Morley, D.; and Keefer, L.K. (1993). Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (Suppl 7): S3-S9.

78. Nathan, C.; and Hibbs, J.B. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrofague antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 65-70.
79. Needleman, H.L.; and Leviton, A. (1982). Lead associated intellectual defect. *N. Engl. J. Med.* 306: 367.
80. Needleman, H.L.; Gunne, C.; Leviton, A.; Reed, R.; Peresie; H.; Maher, C.; and Barret, P. (1979). Defects in psychologic and classroom performance in children with elevated dentine levels. *N. Engl. J. Med.* 300: 689-695.
81. Neri, L.C., Hewitt, D., and Orser, B. (1988). Blood lead and blood pressure: analysis of cross-sectional and longitudinal data from Canada. *Environ. Health Perspect.* 78 : 123-126.
82. Nolan, C.V., and Shaikh, Z.A. (1992). Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology* 73: 127-146.
83. Norel, X.; Walch, L.; Constantino, M.; Labat, C.; Gorenne, I.; Dulmet, E.; Rossi, F.; and Brink, C. (1996). M<sub>1</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in human pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 119 (1): 149-157.
84. Nowack, R.; Wiecek, A.; Exner, B.; Gretz, N.; and Ritz, E. (1993). Chronic lead exposure in rats: effects on blood pressure. *Eur. J. Clin. Invest.* 23 (7): 433-443
85. Oishi, H.; Nakashima, M; Totoki, T. and Tomokuni, K. (1996). Chronic lead exposure may inhibit endothelium-dependent hyperpolarizing factor in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28 (4): 558-563.

86. Palmer, R.M.J.; Ferrigo, A.G.; Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 325: 524-525.
87. Pappas, J.B.; Ahlquist, J.T; Allen, E.M.; and Banner, W. (1995). Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: Effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133 (1): 121-129.
88. Perry M. H. (1988). Increase in the blood pressure of rats chronically fed low levels of lead, *Environmental Health perspectives* 78:107-111
89. Pirkle, J.L.; Schwartz, J.; Landis, R.; and Harlan, W.R. (1985). The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *Am. J. Epidemiol.* 121: 246-258.
90. Pocock, G.; and Simons, T.J. (1987). Effect of lead ions on events associated with exocytosis in isolated bovine adrenal medullary cells. *J. Neurochem.* 48 (2): 376-382.
91. Quilley, J.; Fulton, D.; and McGiff, J.C. (1997). Hyperpolarizing factors. *Biochem. Pharmacol.* 54 (10): 1059-1070.
92. Seshia, S.S.; Rajani, K.R.; Boeckx, R.L.; and Chow, P.N. (1978). The neurological manifestations of chronic inhalation of leaded gasoline. *Dev. Med. Child. Neurol.* 20: 323-334.
93. Sharp, D.S., Osterloh, J., Becker, C.E., et al. (1988). Blood pressure and blood lead concentration in bus drivers. *Environ. Health Perspect.* 78 : 131-137.

94. Sharp, D.S.; Becker, C.E.; and Smith, A.H. (1987). Chronic low-level lead exposure. Its role in the pathogenesis of hypertension. *Med. Toxicol.* 2: 210-232.
95. Simons, T.J. (1993). Lead-calcium interaction in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology* 14 (2-3): 77-85.
96. Tsao D. A. (2000) The Change of beta-adrenergic system in lead induced hipertension. *Toxicol Appl. Pharmacol* 15;164(2):127-33
97. Tsou, t.c., Tsai, F.Y., Hsieh Y.W., Li, L.A., Yeh, S.C., Chang, L.W. (2005). Arsenite induces endothelial cytotoxicity by down-regulation of vascular endothelial nitric oxide synthase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208(3): 277-284.
98. Unni, R.C.; and Caspers, M.L. (1984). Inhibition of bovine plasma amine oxidase by lead. *Biochem. Pharmacol.* 33: 2149-2151.
99. Valencia I. (2001). Lead Induces endothelium and Ca independent contraction in aortic rings *Pharmacology & Toxicology* 89:177-182
100. Vanhoutte M. P., (2003) Endothelial control of vasomotor function, *Circ J* 67: 572-575
101. Vanhoutte, P.M.; and Mombouli, J.V. (1996). Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 39 (3): 229-238.
102. Vaziri N. D. (1999) Nitric Oxide Synthase Expression in the course of lead induced hypertension, *Hypertension* 34: 558-562
103. Vaziri N. D. (1999), Increased nitric oxide activation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension, *Kidney International* 56:4 pp1492

104. Vaziri N. D. (2001) Compensatory Up-regulation of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Lead-induced hypertension; reversal superoxide dismutase-mimetic drug, JPET 298:679-685
105. Vaziri N. D. (2002) Pathogenesis of lead induced hypertension: role of oxidative stress, J Hypertens 20; Suppl 3: S15-20
106. Vaziri N.D. and Ding Y. (2001). Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells. Hypertension 37: 223-226
107. Vaziri N.D. and Sica D.A. (2004). Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. Curr. Hypertens. Rep. 6(4): 314-320.
108. Walsh P. M. (1994) Regulation of vascular smooth muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol. Vol. 72 pp.919-935
109. Wang, Y.; and Marsden, P.A. (1995). Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. Adv. Pharmacol. 34: 71-90.
110. Warner, T.D. (1996). Influence for endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells. Int. Angiol. 15 (2): 93-99.
111. Wedgwood, S. and Black S.M. (2004). Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. Am. J. Physiol. Lung Cell. Moll. Physiol. L480-L487.
112. Wolin, M.S. (1996). Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. Microcirculation 3 (1): 1-17.



113. Yen, J. L., Su, N-Y, and Kaiser, P. (2005). The Yeast Ubiquitin Ligase SCF<sup>Met30</sup> Regulates Heavy Metal Response. *Molecular Biology of the Cell* 16: 1872–1882