

*CADMIU Y PRESION ARTERIAL EN RATAS:
EFECTO SOBRE NATRIURESIS Y REACTIVIDAD VASCULAR*

TESIS

Presentada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con mención en

Zoología

Facultad de Ciencias

por

Alejandro Ernesto Peña Leiva



Director de tesis Dr. Sergio Iturri D.

Santiago, Diciembre 1990

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFURME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

ALEJANDRO ERNESTO PEÑA LEIVA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Zoología, en el examen de defensa de tesis rendida el día 12 de Diciembre de 1990.

Profesor Patrocinante de Tesis:

Dr. Sergio Iturri Duque



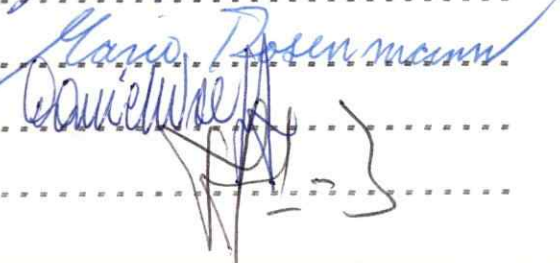
Comisión Informate de Tesis:

Dr. Juan Roblero

Dr. Mario Rosenmann

Dr. Daniel Wolff

Dr. Fernando Zambrano





A Angélica, por su constante motivación

A mi hijo Victor Alfredo.

Esta Tesis fue realizada en el Departamento de Ciencias Ecológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio Iturri D.



Quisiera expresar mi reconocimiento y gratitud a

Dr. Sergio Itutti D., Dra. Berta Zamorano G., por su permanente estímulo e infinita paciencia y guía, en el desarrollo de este trabajo.

Dr. Fernando Zambrano, Dr. Daniel Wolff, Dr. Juan Roblero, por su inapreciable crítica que sin duda construyeron a enriquecer esta tesis.

Dr. Mario Rosenmann, por sus aportes, críticas y enseñanza que sin duda contribuyeron en mi formación y enriquecieron esta tesis.

Sra. Silvia Ussandón y Sra. Mónica Cisternas por su generosa e inagotable paciencia en la transcripción de este trabajo.

Sr. Claudio Rodríguez, Sr. Eduardo Meza, por su asistencia en el trabajo de computación. Al Sr. Ramón Soto por su cooperación en el trabajo de laboratorio.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
<i>Lista de tablas.....</i>	<i>VI</i>
<i>Lista de Figuras.....</i>	<i>VII</i>
<i>Resumen.....</i>	<i>VIII</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>XI</i>
<i>Introducción.....</i>	<i>1</i>
<i> Hipótesis de trabajo.....</i>	<i>17</i>
<i> Objetivos Específicos.....</i>	<i>19</i>
<i>Materiales y Métodos.....</i>	<i>21</i>
<i> Animales de Experimentación.....</i>	<i>21</i>
<i> Evaluación de la Presión Arterial Sistólica.....</i>	<i>21</i>
<i> Protocolo Experimental.....</i>	<i>22</i>
<i> Cuantificación de Electrolitos.....</i>	<i>24</i>
<i> Estudio de Volumen Sanguíneo.....</i>	<i>25</i>
<i> Evaluación de Metalotioneína.....</i>	<i>27</i>
<i> Reactividad Vascular.....</i>	<i>29</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>32</i>

<i>A.</i>	<i>Respuestas de los grupos expuestos a Cadmio..</i>	<i>32</i>
<i>A. 1.</i>	<i>Presión Arterial.....</i>	<i>32</i>
<i>A. 2.</i>	<i>Cuantificación de Electrolitos.....</i>	<i>36</i>
<i>A. 2. 1.</i>	<i>Excreción de Sodio.....</i>	<i>36</i>
<i>A. 2. 2.</i>	<i>Excreción de Potasio.....</i>	<i>39</i>
<i>A. 2. 3.</i>	<i>Excreción de Cloruro.....</i>	<i>41</i>
<i>A. 3.</i>	<i>Electrolitos en el Plasma.....</i>	<i>43</i>
<i>A. 4.</i>	<i>Cuantificación de Volumen Sanguíneo.....</i>	<i>44</i>
<i>A. 5.</i>	<i>Evaluación de Metalotioneína en los cuatro grupos.....</i>	<i>47</i>
<i>B.</i>	<i>Estimación de Reactividad Vasular.....</i>	<i>50</i>
<i>Discusión.....</i>		<i>55</i>
	<i>Cadmio y Presión Arterial Sistólica.....</i>	<i>56</i>
	<i>Balance de Electrolitos.....</i>	<i>58</i>
	<i>Cadmio y Reactividad Vasular.....</i>	<i>60</i>
	<i>Metalotioneína.....</i>	<i>62</i>
<i>Conclusiones.....</i>		<i>64</i>
<i>Bibliografía.....</i>		<i>66</i>

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA I Efecto de cadmio en la excreción urinaria de sodio, potasio, cloruro.....	37
TABLA II Efecto de cadmio sobre las concentraciones de sodio, potasio y cloruro plasmático.....	44
TABLA III Efecto de cadmio en el hematocrito, volumen plasmático y volumen sanguíneo.....	46
TABLA IV Cambios de actividad contractil de arteria mesentérica inducida por N-Epinefrina en presencia y ausencia de Cadmio.....	52
TABLA V Cambios de la actividad contractil de arteria mesentérica inducida por Angiotensina II en presencia y ausencia de Cadmio.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<i>FIGURA 1 Efecto de cadmio en la presión arterial sistólica.....</i>	<i>54</i>
<i>FIGURA 2 Efecto de cadmio en la presión arterial media.....</i>	<i>35</i>
<i>FIGURA 3 Efecto de cadmio en la excreción de sodio.....</i>	<i>38</i>
<i>FIGURA 4 Efecto de cadmio en la excreción de potasio... </i>	<i>40</i>
<i>FIGURA 5 Efecto de cadmio en la excreción de cloruro... </i>	<i>42</i>
<i>FIGURA 6 Efecto de cadmio en la inducción de metalotioneína hepática de la rata.....</i>	<i>48</i>
<i>FIGURA 7 Efecto de cadmio en la inducción de metalotioneína renal de la rata.....</i>	<i>49</i>
<i>FIGURA 8 Algunas respuestas típicas de trozos de arterias mesentérica a cadmio, antes y después de la administración de N-Epinefrina o Angiotensina II.....</i>	<i>54</i>

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado, considerado uno de los más importantes contaminantes ambientales. En los animales se ha demostrado que la ingesta aguda o crónica de este ión, provoca principalmente una acción tóxica sobre la función renal, tejido hepático y un incremento de la presión arterial.

El propósito principal de esta tesis es aportar evidencias experimentales, que ayuden a precisar los mecanismos responsables de la hipertensión, observada en aquellos individuos expuestos a cadmio, tales como aquellos que regulan la volemia o la vaso contricción. Por tal razón se estudió la acción de este metal pesado, sobre parámetros fisiológicos, relacionados con la función renal, hepática y circulatoria, tales como la natriuresis, la concentración plasmática de los iones sodio, potasio, cloruro y el volumen sanguíneo. Se estudió además, el efecto de este elemento sobre la reactividad de la musculatura lisa, usando como modelo vasos sanguíneos aislados (in vitro) de arterias mesentéricas, frente a hormonas presoras. Paralelamente, se determinaron los niveles de metalotioneína en hígado y riñón, en animales adreoprivos (ADX) y animales intactos (Sham).

Los resultados obtenidos indican que la administración de cadmio por vía intraperitoneal, induce un aumento significativo de la presión arterial y de la excreción de sodio. Por otra parte, los niveles plasmáticos de sodio, potasio y cloruro no mostraron diferencias significativas con respecto a los valores del grupo control. En las evaluaciones de volumen sanguíneo se observó una disminución significativa de éste en los grupos ADX + Cd^{2+} y ADX + suero salino, con respecto al grupo control que permaneció con las adrenales intactas. En relación a los niveles de metalotioneína, proteína postulada como un agente detoxificador, estos aumentaron tanto a nivel hepático como renal en aquellos grupos que estuvieron expuestos a este metal pesado.

Por otra parte, en los estudios de reactividad vascular, se observó un aumento de la tensión en aquellas arterias que estuvieron expuestas previamente a cadmio, por espacio de 2 a 3 minutos, observándose un incremento de dicha tensión equivalente a 2.4 veces con N-Epinefrina (0.2 $\mu\text{g/ml}$) y de 7.6 veces para Angiotensina II (1.0 ng/ml). Estos valores, sugieren que el cadmio es capaz de potenciar el efecto de estas drogas vasoactivas, sobre la musculatura lisa vascular.

Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis que el cadmio aumenta la actividad de la musculatura lisa de vasos sanguíneos, contribuyendo a aumentar la resistencia periférica, lo que en parte explicaría el incremento de la presión arterial. Por otra parte, los niveles de metalotioneína en el hígado y el riñón aumentan en aquellos grupos que estuvieron expuestos a cadmio.

ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal and one important pollutant. For animal organisms it is a poison affecting several systems and organs such as kidney and liver.

In this thesis the action of cadmium over natriuresis and the activity of the smooth muscle of isolated mesenteric blood vessels (in vitro) on Sprague-Dawley female adult rats was studied.

Rats were randomly assigned in six groups (Control, ADX + s.s., Sham + s.s., Intact + Cd²⁺, Sham + Cd²⁺, ADX + Cd²⁺) to study the effect of cadmium on blood pressure and sodium excretion. The first three groups were injected i.p. with 0.1 ml of saline solution. The metal was administered in 0.1 ml of saline solution at a concentration of 1.0 µmol/100 b.w. in the last three groups. In addition to the measurement of arterial pressure, blood volume and vascular reactivity, the plasmatic concentration, excretion level of sodium, potassium and chlorine, as well as metallothionein concentration in liver and kidney were determined.

The results show that arterial pressure and sodium excretion increased in those groups exposed to cadmium in comparison to those rats from the control group ($p < 0.05$). A decrease of blood volumen in ADX + Cd²⁺ and ADX + s.s. was observed from the control group ($p < 0.05$). No significant differences were found with plasmatic sodium, potassium and chlorine levels compaired to those from the control group. Metallothionein levels appeared increased both in liver and kidney, in groups exposed to cadmium.

The vascular reactivity measured in strips of mesenteric artery was studied adding norepinephrine (0.2 µg/ml) or angiotensine II (1.0 ng/ml) in bath solution with or without Cadmium (1.0 µmol/ml of bath solution). Vascular reactivity was measured as changes in tension which were later on expressed as areas under the curve. The tension increased when the strip was challenged with norepinephrine or angiotensine II, and this increment was more noticeable when cadmium was present.

The results of this thesis shows that the activity of smooth muscle increased with cadmium influences, then increased the periferic resistance which would contribute to increase the arterial pressure. On the other hand, the

metallothionein levels of the kidney and liver increased in those groups that were cadmium exposure.

INTRODUCCION

Los metales pesados pueden tener efectos tóxicos en la salud humana en concentraciones muy bajas, sin embargo, su significado y la magnitud de su contribución a la etiología de enfermedades crónicas en el hombre, aún no está bien establecida (Kopp et al.; 1980).

Uno de estos metales pesados es el cadmio. Tiene una densidad de 8.65 g/ml, pertenece al grupo II B del sistema periódico, junto al zinc y mercurio, cuyo número y peso atómico son 48 y 112.4 respectivamente. De sus propiedades fisicoquímicas destacan entre otras, su ductibilidad y resistencia a la corrosión, presentando un punto de fusión de 321 °C y de ebullición igual a 767 °C.

Se obtiene como producto secundario de la fundición de minerales de zinc y forma complejos muy fuertes con grupos cianuros y aminas. Es ampliamente utilizado en galvanoplastia, fotografía, confección de pigmentos para pintura y como estabilizador de plásticos, entre otros. La presencia de este metal en la atmósfera, agua y suelo proviene de una variedad de fuentes naturales

y de la acción antropogénica, derivada de la producción de cobre y zinc. Al respecto, se ha estimado un flujo total de 80×10^3 Kg al año de cadmio a la atmósfera, de los cuales el 90% proviene de la actividad humana (Nriagu, 1981).

En este contexto, evaluaciones de este metal realizadas en los alrededores de Santiago de Chile, mostraron valores cercanos a 8.9×10^{-9} moles/100g de tejido de este ión en cultivos agrícolas. Las aguas de riego (aguas servidas), utilizadas para estos cultivos, presentaron valores aproximados a 4.5×10^{-11} M, indicando que los vegetales tienen la capacidad de concentrar cadmio en sus tejidos (Lornejos y Díaz, 1982). La Organización Mundial de la Salud en conjunto con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), han establecido los valores de ingesta de cadmio entre 59.6 y 73.8 μ moles/kg de peso corporal por semana (Codex Alimentarius, 1976).

Dado que no existen mecanismos fisiológicos efectivos para la excreción de cadmio, su acumulación en tejido humano, presenta una relación directa con la edad y los niveles de exposición (Nriagu, 1981; Kopp et al.,

1982). Por ende, las diferencias geográficas en la incidencia de mortalidad por problemas cardiovasculares, está correlacionada directamente con las concentraciones de cadmio en el ambiente (Kopp et al., 1980).

En virtud de esta aparente asociación en humanos, indicadores toxicológicos, tales como crecimiento y parámetros hematológicos, característicos en varios modelos de animales, se alteran por exposiciones a niveles ambientales de cadmio, siendo el promedio de ingesta diaria en el americano y europeo entre 4.4×10^{-7} moles/día y 6.2×10^{-7} moles/día (Kopp et al., 1980).

Las respuestas fisiológicas a diferentes concentraciones de iones metálicos pueden ser variadas. Los niveles de aquellos iones metálicos que tienen alguna función biológica tales como sodio, potasio, hierro y calcio, se regulan normalmente en el organismo, controlando sus ingresos y egresos a través de mecanismos fisiológicos bien determinados (Ganong, 1982). Sin embargo, aquellos iones como cadmio que no son requeridos en procesos fisiológicos, se acumulan en órganos y tejidos, por presentar una excreción muy lenta (Nordberg et al., 1971; Hayashi et al., 1978; Wapnir et al., 1979; Osuna et al.,

1982, ocasionando daño a corto o mediano plazo. De ahí que es importante caracterizar las respuestas de los organismos ante la presencia y acumulación de este ión.

La literatura señala al cadmio como uno de los elementos más tóxicos a nivel renal y hepático (Exon, 1977; Kidlington et al., 1981). Tiene una vida media biológica de 10 a 30 años, produciendo un aumento progresivo de los niveles de este tóxico en los distintos tejidos (Berman, 1980) y aumentando así el daño orgánico. Las principales vías de incorporación de cadmio al organismo son a través del sistema respiratorio y del sistema gastrointestinal, observándose que a través de la primera ruta se logra retener hasta un 40% de la dosis total. Mientras que, por medio del sistema gastrointestinal, vía de incorporación considerada no ocupacional, los porcentajes de absorción fluctúan entre un 3% y un 10% de la cantidad ingerida (Goodman and Gilman, 1978; Nriagu, 1981).

En relación a la ingesta de cadmio por la vía gastrointestinal, se observa que ésta depende de una serie de factores tales como:

- Contenido en la dieta de sales de calcio, hierro, zinc, cobre, manganeso (Van Berneveld, 1985).
- Forma química en que se presenta el metal pesado (cloruro, acetato, sulfato).
- Contenido protéico en la dieta.
- Ingesta de bebidas alcohólicas, edad, sexo (Nriagu, 1981).

A pesar de que en la actualidad no se conoce su acción específica en el metabolismo animal (Berman, 1980; Mertz, 1981), los efectos generales más importantes del cadmio en mamíferos son los siguientes:

- Alteración de los mecanismos de control homeostáticos del sistema circulatorio, renal y hepático.
- Interfiere la absorción de nutrientes a nivel intestinal (Goodman and Gilman, 1978; Iturri y Peña, 1986).
- Produce importantes interacciones con otros metales divalentes, tanto a nivel de absorción de éstos iones como de efecto competitivo a nivel de tejidos. Por ejemplo, la acumulación de cadmio en el hígado y en

el riñón inducen la inhibición de enzimas tales como $(Na^+ + K^+) - ATPasa$, $Mg^{2+} - ATPasa$ sensible a oligomicina, inhibición que se traduce en una alteración de los mecanismos dependientes de sodio (Nriagu, 1981).

La intoxicación aguda puede resultar, principalmente, por ingestión de sales de cadmio, aunque también puede provenir de la inhalación de polvos y vapores, especialmente de óxidos de cadmio, siendo esta última forma de exposición más agresiva. Los principales efectos de la intoxicación por vía oral son náuseas, vómitos, sialorrea, diarrea y calambres abdominales. Por ejemplo, entre los signos y síntomas que aparecen a las pocas horas, después de la inhalación de compuestos de cadmio se incluyen la irritación del tracto respiratorio superior, dolores torácicos, náuseas, mareos y diarrea (Goodman and Gilman, 1978). La muerte se produce por edema pulmonar, observándose además en estos casos, inflamaciones agudas en el riñón y degeneración grasa del tejido hepático (Berman, 1980). Por otra parte, la principal vía de excreción de cadmio es a través de las heces. Luego de su absorción, este ión es transportado en el plasma, especialmente unido a albúmina, desde donde se incorpora a la bilis probablemente unido a glutatión

/

(GSH), para luego formar parte de las fecas (Nriagu, 1981). Otra de las vías de excreción de este metal pesado, la constituye la orina, donde se ha determinado en ratas, valores que fluctúan entre 8.8×10^{-6} y 3.3×10^{-7} moles/kg de peso corporal cuando se ha administrado entre 8.8×10^{-4} y 2.7×10^{-3} moles/kg de peso en el agua de bebida.

Numerosas investigaciones han descrito que determinadas deficiencias de metales esenciales tales como calcio, hierro, cobre, zinc y de las vitamina C y D, pueden agravar el efecto tóxico de los metales pesados en el organismo (Kopp et al., 1980; 1982; Van Berneveld, 1985).

Actualmente, existe una gran cantidad de información referente a los efectos a corto plazo de metales pesados, tales como aminoaciduria, proteinuria, osteoporosis, osteomalasia, enfisema pulmonar, disfunción cardiovascular, alteración del metabolismo hepático, usando diversas vías de ingestión (Revis et al., 1981; Pilati et al., 1982). A pesar de ello se conoce muy poco sobre lo que sucede cuando el individuo se ve expuesto a bajas concentraciones, durante un tiempo prolongado.

En general, los iones de metales pesados tienen la capacidad de combinarse con una variedad de moléculas orgánicas, especialmente con aquellas que poseen radicales sulfhidrilos (-SH), carbonilos, fosfatilos, hidroxilos e histidilos. Estos metales tienen diferente reactividad con el compuesto biológico, de ahí que su fuerza de unión a estos sustratos sea variable. La interacción de cadmio con proteínas, puede producir inhibición parcial o total de la actividad de numerosas enzimas presentes en los tejidos que son blancos de este metal.

Existen evidencias que aquellos organismos expuestos a la acción de algunos metales pesados tales como cadmio, mercurio, plomo, son capaces de inducir la síntesis de una proteína denominada metalotioneína (Kagi and Valle, 1960), proteína que une algunos de estos metales pesados, disminuyendo así su ingreso a la circulación sistémica. Al respecto, se ha demostrado la presencia de metalotioneína a niveles trazas en algunos tejidos como la corteza renal e hígado, (Suzuki et al., 1983; 1983), mientras que su incremento se produce rápidamente, en periodos que van de 8 a 12 horas cuando los organismos están expuestos a altas dosis de cadmio (4.5×10^{-5} y 4.5×10^{-4} M), (Nriagu, 1981). Esta molécula proteica muestra algunas propiedades particulares tales

como, carecer de actividad enzimática, poseer un peso molecular bajo (aproximadamente 6.800 d), tener un alto contenido de cisteína y carecer tanto de aminoácidos aromáticos como de histidina.

Dada la relación observada entre la síntesis de esta proteína y la presencia de iones de metales pesados, se ha sugerido que la función fisiológica de esta proteína sería de detoxificador. Al respecto, se ha demostrado que esta molécula con el metal ligado, se acumula a nivel hepático y renal (Kagi and Valle, 1960; Piscator et al., 1964; Kito et al., 1982; Suzuki et al., 1983; 1983; McCarter and Roch, 1983; Hayashi et al., 1978). Este hecho es fisiológicamente importante, si se considera que la mayoría de los organismos concentran iones de metales pesados. Se comprende entonces que en ambientes donde el incremento de estos iones es cada vez mayor, podría producir una serie de alteraciones en los diversos órganos y sistemas de individuos expuestos a su acción, tal es el caso del riñón y el sistema cardiovascular, entre otros. Al respecto, en individuos expuestos a cadmio se ha encontrado que el riñón es el principal órgano afectado, detectándose que este ión se acumula principalmente en la corteza renal, ligado a metalotioneína, el que posteriormente se excreta junto a esta proteína. En este

contexto se han evaluado los índices de excreción de este ión, llegando a determinarse que un 30% del metal ligado a metalotioneína, es eliminado por la orina (Cherian et al., 1976). Por otra parte, las evidencias experimentales que existen en relación al efecto del cadmio sobre la fisiología renal no están claramente establecidas. Al respecto, administraciones de cadmio iguales a 8.9×10^{-6} moles/kg de peso corporal en ratas, produce una retención efectiva de sodio (Perry et al., 1971; Axelson and Piscator, 1966). Igualmente, la administración de 1.8×10^{-6} moles de cadmio por kilogramo de peso corporal en ratas, produce un aumento de la actividad de la renina en un 250% (Perry et al., 1971). Para explicar este efecto del ión, se sugiere un mecanismo de tipo indirecto que regularía la natriuresis, encontrándose involucrado en dicho mecanismo el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fulke, 1974). Paralelamente, los resultados obtenidos en experimentos sobre efectos agudos realizados en perro, también sugieren una acción del cadmio a nivel de túbulo contorneado proximal, produciendo una alteración no específica de la permeabilidad tubular o alguna acción en el suministro de energía, manifestado por una alteración de los sistemas de transporte a nivel tubular (Vander, 1962). Otra de las alteraciones observadas en individuos expuestos a vapores de óxido de cadmio (4.4×10^{-7} moles/m³) en forma aguda son, glucosuria,

aminoaciduria y proteinuria, encontrándose albúmina como uno de los principales componentes en la orina de dichos sujetos, signo de daño renal (Nriagu, 1981).

Hasta ahora no se ha demostrado que individuos expuestos a concentraciones bajas y permanentes de cadmio presenten una alteración biológica significativa (Kopp et al., 1982). Sin embargo, se ha sugerido que existiría una relación entre el grado de exposición a cadmio y el desarrollo de hipertensión arterial. Dicho fenómeno se caracteriza por un aumento sostenido de la presión en las arterias sistémicas, estableciéndose como referencia los valores de 140/90 mm Hg o mayores para tal patología (Selkurt, 1975). Este aumento de presión arterial, podría asociarse a la incorporación de este metal pesado en bajas concentraciones en forma prolongada, desconociéndose aún su origen. En relación a este punto, la evaluación de los niveles de cadmio en sujetos hipertensos, resultaron ser cuarenta veces más altos que los valores obtenidos en sujetos normotensos, sugiriéndose una relación entre la hipertensión y los niveles de cadmio presentes en dichos sujetos (Kagaminori, 1986). Al respecto, las primeras evidencias las encontramos en los trabajos de Schroeder et al., (1962; 1964), que al administrar 4.4×10^{-5} M de cadmio en forma crónica a ratas Long Evans, induce un aumento de

presión arterial equivalente a un 15% - 20%; los mismos resultados se observan al administrar crónicamente dosis bajas de este ión (4.4×10^{-6} y 8.9×10^{-6} M), (Perry et al., 1976), produciéndose un aumento moderado de la presión arterial, similar a la hipertensión en humanos, desconociéndose el mecanismo por el cual se produce este fenómeno. En experimentos realizados en diferentes cepas de ratas (Long Evans, Wistar, Sprague-Dawley), expuestas a diferentes concentraciones de cadmio en períodos variables de tiempo, se produce un incremento de la presión arterial con respecto a su valor promedio. En estos experimentos se han utilizado diferentes vías de administración, ya sea por vía gastrointestinal o por vía parenteral, en dosis que fluctúan entre 4.4×10^{-6} y 4.4×10^{-4} mol/Kg de peso corporal (Perry et al., 1980; Piscator, 1964; Schroeder, 1962). Por otra parte, con el objeto de evaluar el posible rol etiológico del cadmio en la manifestación de formas de hipertensión, se han utilizado cepas de ratas que genotípicamente desarrollan esta enfermedad, encontrándose que este metal pesado tiene un efecto potenciador en el desarrollo de la hipertensión (Uhanian e Iwai, 1980; Kagaminori et al., 1986).

En relación con los resultados observados, se han propuesto algunos mecanismos que podrían explicar el alza de presión arterial exhibidas en aquellos individuos expuestos a cadmio. El aumento de la presión arterial podría deberse a hipertrofia cardíaca, nefrotoxicidad, por aumento de la concentración de renina plasmática, vasoconstricción e inhibición de la natriuresis (Schroeder et al 1962; Piscator, 1964; Perry et al., 1967; Uhanian e Iwai, 1980; Perry et al., 1980). Sin embargo, las evidencias que existen sobre la alteración de estos mecanismos son poco concluyentes.

Por lo expuesto anteriormente, el sistema cardiovascular parece ser uno de los más vulnerables a la exposición de este contaminante (Uhanian e Iwai, 1980). El papel de este metal pesado en la disfunción cardiovascular ha resultado ser uno de los problemas más controvertidos, fundamentalmente por el hecho de que muchas de las enfermedades cardiovasculares son de naturaleza multifactorial en su origen. A este hecho se agrega una enorme variación de las condiciones ambientales y sociales dentro y entre las poblaciones en estudio, dificultando el poder precisar el o los mecanismos por los cuales el cadmio afectaría la homeostasis circulatoria (Uhanian e Iwai, 1980). En este contexto, la reactividad

vascular, constituye uno de los factores importantes que afecta la presión arterial, dado que cualquier cambio que se observe en la actividad de la musculatura lisa de vasos sanguíneos, produce modificaciones en la resistencia periférica y por ende cambios en la presión arterial. Al respecto, en experimentos realizados en ratas Long-Evans se observó que después de inyectar 3.5×10^{-5} M de cadmio por vía intraperitoneal, se producía un incremento del volumen minuto cardíaco, hecho que podría explicarse por un aumento de la resistencia en las arterias mayores (Perry et al., 1965; 1967). Paralelamente, al perfundir arterias con una solución de cadmio cuya concentración era igual a 1.6×10^{-5} M, se producía un aumento de presión arterial promedio de 18 mm Hg (Perry et al., 1967). Sin embargo, en experimentos realizados en musculatura lisa de aorta perteneciente a ratas contaminadas con cadmio (Golden, 1975) y arterias aisladas de conejos (Thind et al., 1970) expuestas a 4.4×10^{-6} M, se observó una disminución de la capacidad de contracción frente a drogas vasoactivas, tales como N-epinefrina y serotonina comparadas con los controles. Es importante consignar que las catecolaminas, drogas vasoactivas capaces de modificar marcadamente la resistencia periférica, durante su proceso de liberación, requieren de la presencia de calcio a nivel mitocondrial, el que estaría modificado por la presencia de cadmio. En relación a este punto, se ha observado un efecto

inhibitorio del cadmio sobre la actividad de la monoaminooxidasa (MAO) y de la catecolmetiltransferasa, enzimas involucradas en la inactivación de las catecolaminas (Revis, 1978, Shanbaky et al., 1978). Se postula que los procesos de captación y liberación de catecolaminas por parte del sistema nervioso central, son dependientes de los receptores de membranas. Este hecho sugiere que la captación y liberación de DOPA y de N-epinefrina, en las neuronas, son dependientes del transporte activo de iones. Si los dos procesos señalados anteriormente son independientes, cualquier alteración causada por una sustancia tóxica, como el cadmio, podría causar un cambio paralelo en el otro (Hobson et al., 1986). Al respecto, se sabe que cadmio inhibe la $(Na^+ + K^+) - ATPasa$, enzima involucrada en la utilización de la energía asociada a los procesos de transporte de iones (Iturri y Peña, 1986), y la $Mg^{2+} - ATPasa$, sensible a oligomicina, enzima responsable de la síntesis de energía en la mitocondria (Hobson et al., 1986).

Por otra parte, se ha demostrado que existe una importante relación entre el efecto del calcio y la contracción de la musculatura lisa y por ende la reactividad vascular (Hitchcock et al., 1973; Huxley, 1969). En este contexto, Perry (1976), señala que la

acumulación de cadmio a nivel renal, inhibiría la síntesis de 1,25-desoxicolecalciferol, factor importante y necesario para la absorción de calcio (Selkurt, 1975). Este hecho producirá una disminución del calcio plasmático, alterándose de esta manera la actividad de la musculatura lisa y por consiguiente la presión arterial.

De lo anteriormente expuesto, los mecanismos involucrados, propuestos para explicar esta alza de presión arterial están relacionados con el control de la reabsorción de sodio y la reactividad vascular. Al respecto, se ha observado que al administrar dosis de cadmio similares a aquellas que inducen hipertensión (Schroeder, 1964; Schroeder et al., 1962; Perry et al., 1980) producen un efecto antinatriurético. Este hecho se observa más marcadamente cuando las dosis de cadmio son de 8.9×10^{-6} moles/kg de peso corporal, inyectado vía intramuscular (Perry et al., 1971).

HIPOTESIS DE TRABAJO

- 1.- *El cadmio, al inhibir la excreción de sodio, podría producir un aumento de los niveles de sodio en el plasma, aumentando la reactividad vascular y por ende la presión arterial. Por esta razón, un estudio que aclare la participación del cadmio en animales privados de aldosterona (adrenoprivos), hormona responsable de la retención de sodio, permitiría aclarar el posible papel del cadmio sobre el desarrollo de la hipertensión, hecho no descrito hasta el momento.*

- 2.- *Entre los mecanismos propuestos como explicación a dicho aumento de la presión arterial, estaría una mayor reactividad de la musculatura lisa vascular a agentes presores, en individuos expuestos a cadmio, fenómeno que no se ha explicado satisfactoriamente, dada la existencia de resultados contradictorios (Perry et al. 1965; 1967; Thind et al., 1970). De ahí que se propone estudiar el grado de sensibilidad de la musculatura lisa de vasos aislados tratados con cadmio, frente a drogas vasoactivas, lo que nos permitiría precisar la acción del cadmio sobre el tono*

muscular de dichos vasos y probablemente, sobre la presión arterial.

Además, es importante realizar en forma paralela, una evaluación de los niveles de metalotioneína, debido a que se sabe que esta proteína es capaz de ligar cadmio y acumularse en el riñón, siendo este órgano uno de los más afectados. De ahí que, dicho aumento podría estar relacionado con una alteración de la homeostasis hidrosalina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

De acuerdo con los antecedentes expuestos, se deduce que el cadmio es uno de los cationes divalentes que presenta mayor toxicidad a nivel hepático y renal. Debido a que su ingesta se puede realizar por vía oral, a través de los alimentos que provienen de áreas contaminadas, se ha considerado de importancia estudiar los efectos de este ión en alguno de los parámetros fisiológicos que pueden alterarse por la acción de este metal. Los objetivos específicos de esta tesis están orientados a:

- 1.- Evaluar el efecto del cadmio ($CdCl_2$), a una concentración de $1.0 \mu mol/100 \text{ g}$ de peso corporal, en ratas normales y adrenoprivas (ADX) inyectado intraperitonealmente sobre la presión arterial y la natriuresis.
- 2.- Evaluar el efecto del cadmio ($CdCl_2$), a una concentración final de $1.0 \mu M$ sobre la contracción de la musculatura lisa de vasos aislados (in vitro), frente a drogas vasoactivas.
- 3.- Evaluar las concentraciones de metalotioneína hepática y renal, en animales normales y expuestos a cadmio como una posible forma de cuantificar el grado de exposición a este ión y poder correlacionar su presencia con el daño renal,

producto de la acumulación de esta proteína.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En estos estudios se emplearon ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de tres meses de edad y cuyos pesos fluctuaron entre 200 y 230 gramos con un promedio de $219 \pm 3g$. Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Salud Pública y una vez en el vivero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, se mantuvieron con una dieta normal (pellet Purina), agua ad libitum y a una temperatura ambiente entre 20°C y 22°C.

EVALUACION DE LA PRESION ARTERIAL SISTOLICA

En estos experimentos se midió la presión arterial sistólica por método indirecto, en la arteria caudal de cada animal (método pletismográfico) (Pfeffer and Pfeffer, 1971). Cada animal sin anestesia se colocó en una cámara a 38°C, temperatura que se mantuvo con una ampolleta infrarroja, para posteriormente ser transferidas a una jaula de restricción. Se colocó en la cola un transductor para pulso Statham, modelo T 4021, distalmente a la manga del esfigomanómetro, registrándose la señal en un

polígrafo Gilson, modelo ICM-B con un amplificador IC-MP. La presión en el interior de la manga del esfigomanómetro se midió permanentemente a través de un transductor Statham, modelo TP 231D y esta señal se registró en el mismo polígrafo en un segundo canal. La manga se insufló hasta una presión de 200 mm Hg, luego se permitió la salida de aire, lentamente, en un período de 10 segundos. El valor de presión arterial sistólica se igualó al valor de presión registrada en el interior de la manga del esfigomanómetro, en el momento en que reapareció el pulso. Este procedimiento se repitió tres veces en un intervalo de dos minutos y el valor de la presión arterial sistólica final se expresó como el promedio de estas tres mediciones.

PROTUCULO EXPERIMENTAL

En este estudio se utilizaron seis grupos de ocho ratas cada uno, distribuidas aleatoriamente. Los animales de dos de los seis grupos, se anestesiaron con uretano (12,5 mg/100 g de peso corporal) con el objeto de remover las glándulas adrenales quirúrgicamente por vía dorsal. Cuarenta y ocho horas después de la operación se registró la presión arterial sistólica basal en cada animal por el método indirecto ya descrito. A los individuos de uno de

los grupos adrenoprivo (ADX) se les inyectó 1.0 $\mu\text{mol}/100$ g de peso corporal de ión cadmio (Cd^{2+}), disuelto en 0,1 ml de solución salina (NaCl 0,9%) por vía intraperitoneal, mientras que los animales del otro grupo adrenoprivo se inyectaron con 0,1 ml de solución salina (s.s.). El tercer grupo de animales fue sometido a la intervención simulada o ficticia (Sham). Luego de transcurrido cuarenta y ocho horas de la operación, se les administró cadmio (1,0 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de peso corporal), disuelto en 0.1 ml de solución salina por vía intraperitoneal. El cuarto grupo (Sham + s.s.), fue tratado en igual forma que el tercer grupo, al que se le inyectó 0.1 ml de solución salina solamente, por vía intraperitoneal. El quinto grupo (Intacto + Cd^{2+}) se inyectó con cadmio 1.0 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ p.c., disuelto en 0.1 ml de solución salina. El sexto grupo (Control) se inyectó con 0.1 ml de solución salina.

En resumen, el protocolo fue el siguiente:

- Grupo 1. ADX + 1,0 μmol de Cd/100g p.c. en 0,1 ml de s.s.
- Grupo 2. ADX + s.s. (0,1 ml).
- Grupo 3. Sham + 1,0 μmol Cd/100g p.c. en 0,1 ml de s. s.
- Grupo 4. Sham + s. s. (0,1 ml).
- Grupo 5. Intacto + 1,0 μmol Cd/100g p.c. en 0,1 ml de s.s.
- Grupo 6. Control + s. s. (0,1 ml)

Los grupos adrenoprivos (ADX) se mantuvieron con pellet Purina y una solución salina (NaCl 0,9%) como agua de bebida ad libitum. Los otros grupos se mantuvieron con dieta normal de pellet y agua de bebida ad libitum.

Las concentraciones de cadmio usadas en este trabajo, son similares a aquellas empleadas por Schroeder (1962, 1964), Perry et al., (1971), Fulke, (1974), quienes establecen que dichas concentraciones son capaces de producir un alza de la presión arterial sistólica y una disminución de la excreción de sodio entre las veinticuatro y cuarenta y ocho horas, posterior a la administración. Transcurrido este mismo periodo de tiempo, después de la incorporación de cadmio o de la solución salina, se procedió a medir la presión arterial por el método indirecto ya descrito y a la cuantificación de los electrolitos en la orina y en el plasma.

CUANTIFICACION DE ELECTROLITOS

Los animales de los grupos Control, Sham + Cd²⁺, ADX + s.s. y ADX + Cd²⁺, se colocaron en jaulas metabólicas individuales durante ocho horas con el objeto de recolectar orina y proceder a evaluar las excreciones urinarias de

sodio, potasio y cloruro. Igualmente se obtuvieron muestras de sangre heparinizada sin sodio de la arteria carótida y luego de ser centrifugada a 400x g durante 10 minutos se procedió a determinar la concentración plasmática de estas iones. Las determinaciones de sodio y potasio se realizaron por espectrofotometría en un fotómetro de llama Eppendorff. Las determinaciones de cloruros se realizaron por titulación de cloruro con un electrodo de plata, basado en el principio de titulación coulométrica, usando un clorhidrómetro digital, Buchler modelo N-2500. Los iones Hg^+ se originan por pérdida de electrones desde el ánodo de Hg^0 combinándose con los iones Cl^- . Cuando todos los iones Cl^- presentes en la muestra se han precipitado, el exceso de iones Hg^+ producidos se detectan como un aumento de corriente en el indicador del electrodo. La reacción se detiene en este punto amperométrico final y la lectura indica la concentración de Cl^- de la muestra en meq/l .

ESTUDIO DE VOLUMEN SANGUINEO

Cada rata se anestesió con uretano 12,5 mg/100 g peso corporal, para posteriormente aislar y canular la arteria carótida y vena yugular, usando un cateter de plástico Clay-Adams PE 50. Cada animal se heparinizó (3

mg/kg de peso corporal) y a través de la vena yugular se inyectó Azul de Evans (2,0 mg/kg de peso corporal). Por la arteria carótida se retiró 1 ml de sangre cada 3 minutos por un periodo de 9 minutos, restituyéndose cada vez el volumen retirado con solución salina, por la misma vía. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 350x g, durante 10 minutos y se tomó 0,2 ml de plasma, agregando 4,5 ml de ácido tricloro acético p.a. al 10% (p/v), para centrifugar nuevamente a 200x g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 1 ml de ácido clorhídrico p.a. y 4 ml de butanol p.a. Posteriormente se calentó a 65°C durante 2 minutos, volviéndose a centrifugar a 1000x g durante 10 minutos. Del líquido sobrenadante se tomaron alícuotas, que se leyeron a 620 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 (Hunsaker, 1965). Las lecturas de densidad óptica (DO) se graficaron en el eje de las ordenadas y el tiempo en el eje de las abscisas, para luego calcular la ecuación de la recta considerándose el punto de intersección en el eje de las ordenadas como el valor máximo de la densidad óptica (valor obtenido a tiempo cero). Este valor se interpoló en una curva de calibración de Azul de Evans para obtener la concentración del colorante en la muestra, valor que posteriormente se utilizó para calcular el volumen plasmático (VP) de acuerdo a la siguiente relación:

A. Evans inyectado x 1000 (µg)

VP = -----

A. Evans de la muestra (µg/ml) x 10 (dilución)

Luego, el volumen sanguíneo (VS) se calculó usando los valores obtenidos de volumen plasmático y el hematocrito de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$VS = \frac{VP}{1.0 - Hct}$$

EVALUACION DE METALOTIONEINA

Las determinaciones de metalotioneína se realizaron por polarografía de pulso diferencial, método que permite evaluar rápidamente moléculas protéicas en homogenizados crudos. Brdicka (1933) determinó el contenido de grupos

sulfhidrilos usando una solución tamponada de amonio-cobalto; y dado que metalotioneína es una proteína que posee una gran cantidad de estos grupos, la polarografía diferencial de pulso es un excelente método para cuantificar rápidamente esta proteína en muestras de tejidos (Olafson et al., 1979). Finalizada las determinaciones de volumen sanguíneo, las ratas se sacrificaron y se les extrajo los riñones y el hígado, los que se guardaron a -20°C hasta ser utilizados. De estos órganos se tomaron muestras (300 mg a 400 mg) y se homogenizaron en una solución salina (NaCl 0,9%) usando un homogenizador de tejido, Tissue Myzer, modelo SDT 1810. Las muestras se incubaron en un baño a 85°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a $1.000\times g$ durante 20 minutos, y del líquido sobrenadante obtenido se tomaron 25 μl que se agregaron a una cubeta que contenía 10 ml del electrolito soporte, cuya composición es (M): hexaaminocloruro de cobalto (6.4×10^{-5}), cloruro de amonio (1,0), hidróxido de amonio (1,0), regulada a pH 9,0 (Palecek et al., 1971). Las muestras se analizaron en un polarógrafo Princeton Applied Research, modelo 174A, usando un electrodo de mercurio por goteo SMDE, modelo 303, conectado a un inscriptor Watanabe modelo WX 4301, manteniendo las siguientes condiciones de registro: el barrido del potencial fue de -1,6 a -1,35 voltios, con una velocidad de barrido de 5 mv/s y una modulación de

amplitud de 50 mv. El tiempo de goteo del electrodo se ajustó a 0,5 seg, y la temperatura de la cubeta se mantuvo a 25°C (Olafson et al., 1979).

Los resultados se expresaron como µg de proteína/mg de tejido.

REACTIVIDAD VASCULAR

Las concentraciones de cadmio usada en este diseño experimental es similar a la utilizada por Perry and Yunice (1965), Thind et al. (1970) y Pilati et al. (1982), donde se establece que esta concentración es capaz de producir cambios en la reactividad vascular de trozos de arteria aorta abdominal y arteria mesentérica. Por tal razón, se procedió a evaluar el efecto del cadmio ($CdCl_2$) a una concentración de 1.0 µM sobre la contracción de la musculatura lisa de acuerdo a la siguiente metodología: se tomaron ratas hembras, cuyos pesos fluctuaron entre los 200 y 230 g, mantenidas con dieta normal y agua ad libitum, se sacrificaron por medio de un golpe en la base del cráneo. Se extrajo rápidamente la arteria mesentérica superior y se colocó en una cápsula de Petri, que contenía solución salina (NaCl 0.9%) a 4 °C. La arteria se cortó helicoidalmente formando una cinta de 5 a 7 mm de

logitud. Uno de los extremos del trozo helicoidal se sujetó a un soporte fijo de vidrio, mientras que el otro se sujetó a un transductor de fuerza Statham DCR, modelo 1030 conectado a un polígrafo Gilson, modelo ICM-8 con un preamplificador IC-MP. Todas las cintas helicoidales de arterias mesentéricas se colocaron en un baño termorregulado, a 37°C, el que contenía suero fisiológico cuya composición fue la siguiente (mM): NaCl 119; KCl 4,7; NaH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,3; CaCl₂ 2,4; glucosa 5,0; dextrosa 5,5; y burbujeada con una mezcla de 95% O₂ - 5% CO₂, manteniendo la solución a pH 7,3. Antes de comenzar los experimentos, todas las preparaciones se equilibraron por un periodo de 60 a 90 minutos. en el suero fisiológico, el que se reemplazó periódicamente cada 15 a 20 minutos. Los ensayos de Angiotensina II o de N-Epinefrina se llevaron a cabo agregándolas en una sola concentración (1.0 ng/ml y 0.2µg/ml respectivamente) directamente en el baño (Bohr et al. 1961) en presencia o ausencia de 1.0 µM de cadmio (CdCl₂).

El sistema se calibró de tal manera que una tensión aplicada al transductor, producto de la contracción del vaso aislado en el baño, correspondía a una deflexión de la aguja inscriptora calibrada previamente en centímetros. Los cambios de tensión, se homologaron a las variaciones

de área bajo la curva al administrar las drogas (Stander, 1966), las que se evaluaron antes y después de la administración de la droga, usando un método de graficación, asistido por computación.

Los resultados están expresados como los valores promedios \pm error estandar. Los análisis estadísticos se realizaron usando ANOVA (Sokal and Rohlf, 1969), y la prueba de Dunnett, un test a posteriori que determina diferencias de los tratamientos comparándolos con un control (Steel y Torrie, 1985), siendo el nivel de significación empleado en todos los análisis de un $p < 0.05$.

RESULTADOS

A. RESPUESTA DE LOS GRUPOS EXPUESTOS A CADMIO

A.1. PRESION ARTERIAL

Los valores de presión arterial sistólica obtenidos en los seis grupos de animales se encuentran resumidos en la figura 1. En ésta se observan los valores de presión sistólica inicial (antes de administrar el cadmio) y los valores finales (después de administrar $1.0 \mu\text{mol}$ de $\text{Cd}/100 \text{ g.p.c.}$) de todos los grupos. Estos resultados muestran un incremento de la presión sistólica final (Pf) de un 20% para el grupo Sham + Cd^{2+} , de un 19% para el grupo Intacto + Cd^{2+} y de un 11.6% para el grupo ADX + Cd^{2+} con respecto al grupo control, siendo estos porcentajes significativos ($p < 0.05$). Los valores observados para los grupos ADX + s.s. y Sham + s.s. no fueron significativos. Por otra parte, al comparar los valores de presión sistólica finales (PF) e iniciales (PI) de cada grupo individual, se observa un aumento máximo de un 30% en el grupo Sham + Cd^{2+} , de un 28% para el grupo Intacto + Cd^{2+} y de un 32.8% para el grupo ADX + Cd^{2+} , porcentajes que resultan significativos con respecto a la presión sistólica inicial de cada grupo ($p < 0.05$). Para

el grupo control la presión sistólica final, no fue estadísticamente diferente de la presión sistólica inicial.

Las determinaciones de presión arterial media, obtenida por canulación de la arteria carótida (fig 2), muestra que los individuos del grupo ADX + Cd²⁺ presentan un aumento equivalente a un 36% con respecto a los animales del grupo control, incremento ligeramente superior al observado en este grupo cuando se determinó la presión arterial sistólica, medida indirectamente. Sin embargo, los grupos Sham + Cd²⁺ y ADX + s.s. si bien presentaron un ligero incremento, éste no se diferenció significativamente del grupo control.

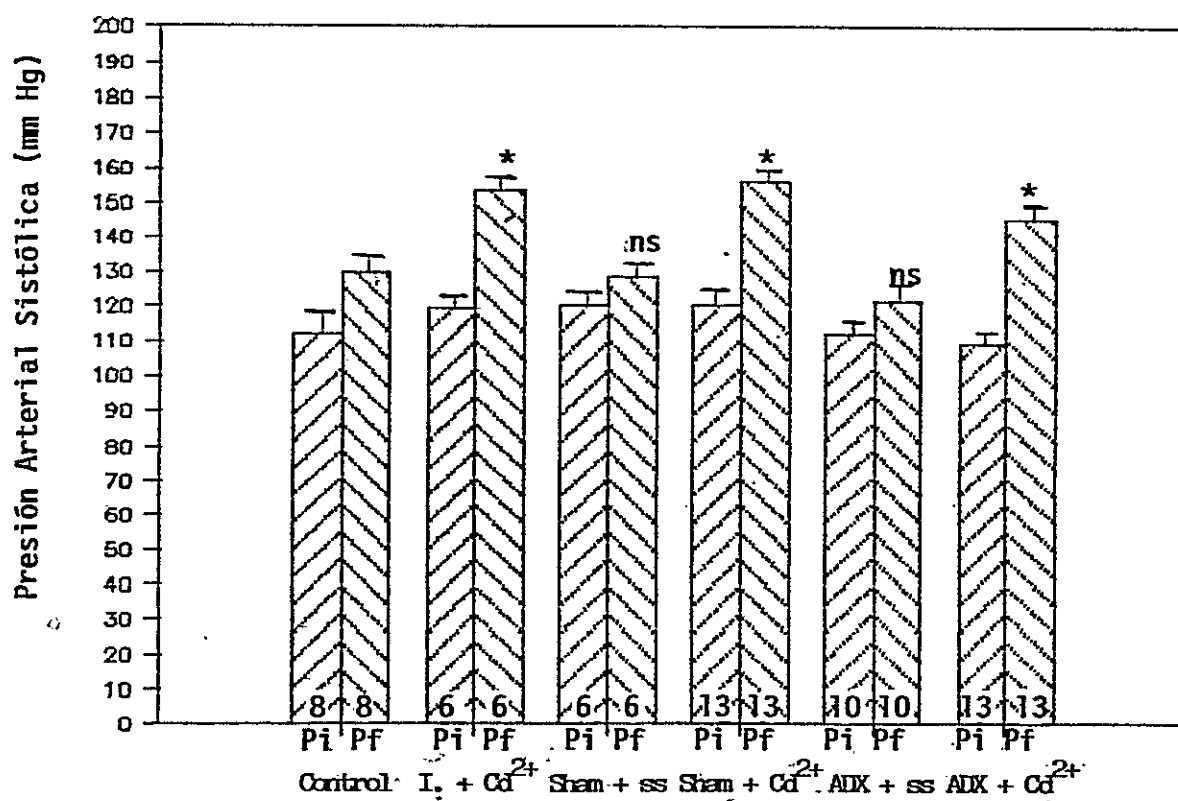


Fig. 1: Efecto de Cd²⁺ (1 μ mol/100 g p.c.) administrado i.p. sobre la presión arterial sistólica.

Los resultados (promedios \pm E.S.) de presión inicial (Pi) y presión final (Pf) están expresados en mm Hg.

Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativo ($p < 0.05$)

ns : no significativo.

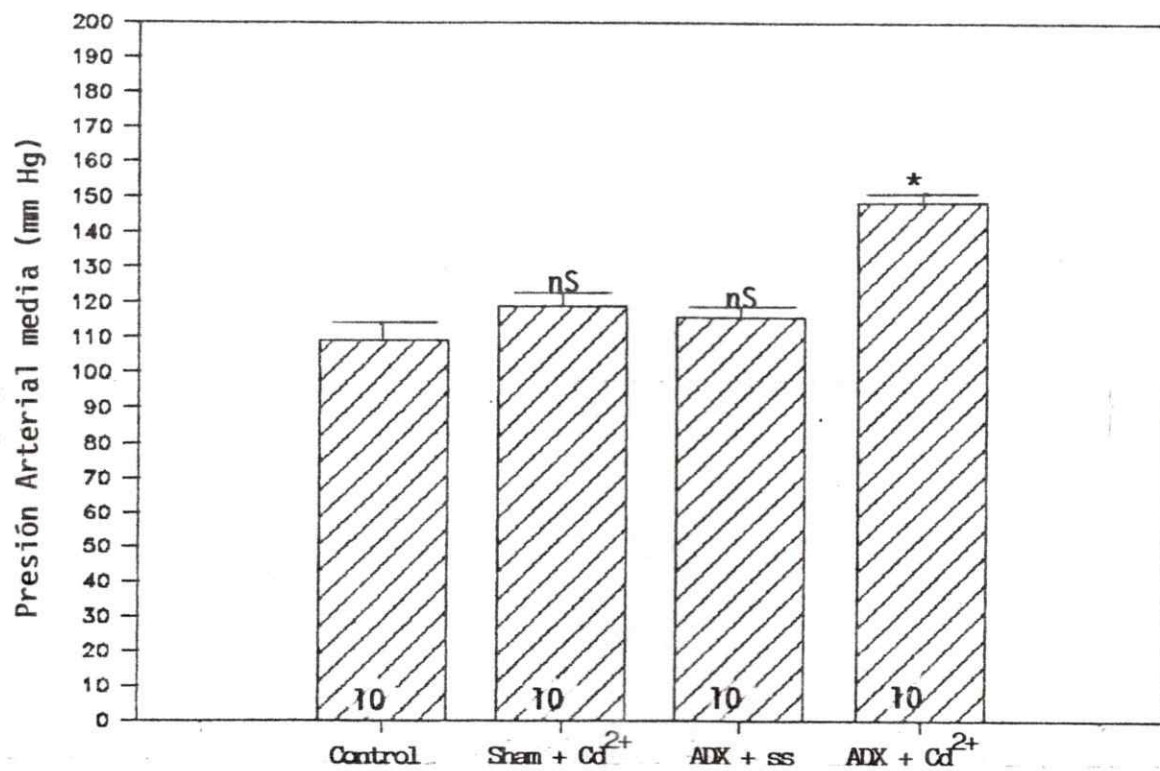


Fig. 2: Efecto de Cd^{2+} ($1 \mu\text{mol}/100 \text{ g p.c.}$) administrado i.p. sobre la presión arterial media de la rata.

Los resultados (promedios \pm ES) están expresados en mm Hg.

Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativo ($p < 0.05$)

ns : no significativo.

A.2. CUANTIFICACION DE ELECTROLITOS

A.2.1. EXCRECION DE SODIO

Los valores de excreción de sodio de los grupos Control, Sham + Cd^{2+} , ADX + s.s. y ADX + Cd^{2+} se muestran en la figura 3 y están resumidos en la tabla 1. Se puede observar que no existe diferencia significativa entre los valores promedios de excreción de sodio en el grupo Sham + Cd^{2+} comparados con los valores promedios del grupo Control. Sin embargo, los promedios de excreción de sodio del grupo ADX + Cd^{2+} y ADX + s.s. resultan ser mayores que los valores del grupo control, siendo dicho aumento equivalente a 12.3 ($p < 0.01$) veces para el grupo ADX + Cd^{2+} y 4.6 ($p < 0.01$) veces para el grupo ADX + s.s., valores que resultan significativos con respecto al grupo control. Por otra parte, cuando se comparan los promedios de excreción de sodio del grupo ADX + Cd^{2+} con respecto a los valores del grupo ADX + s.s., se observa un aumento de la excreción de sodio equivalente a un 2.7 veces en el primer grupo (ADX + Cd^{2+}), valor que resulta estadísticamente significativo con respecto al grupo ADX + s.s ($p < 0.05$).

TABLA 1. Efecto de Cd^{2+} en la excreción urinaria de Na^+ , K^+ y Cl^-

Tratamiento	Excreción Urinaria de Electrolitos (mEq/8h.)		
	Na^+	K^+	Cl^-
Control	(11) 0.10 \pm 0.02	(7) 0.071 \pm 0.007	(15) 0.61 \pm 0.10
Sham + Cd^{2+}	(13) 0.10 \pm 0.01	(13) 0.048 \pm 0.010	(12) 1.03 \pm 0.26
ADX + S.S.	(10) 0.46 \pm 0.07*	(10) 0.016 \pm 0.003*	(11) 0.94 \pm 0.16
ADX + Cd^{2+}	(13) 1.23 \pm 0.20*	(8) 0.062 \pm 0.010	(13) 2.68 \pm 0.41*

: Promedio \pm E.S.; el número de experimentos se indica en paréntesis.

* : Significativamente diferente del control ($p < 0.05$)

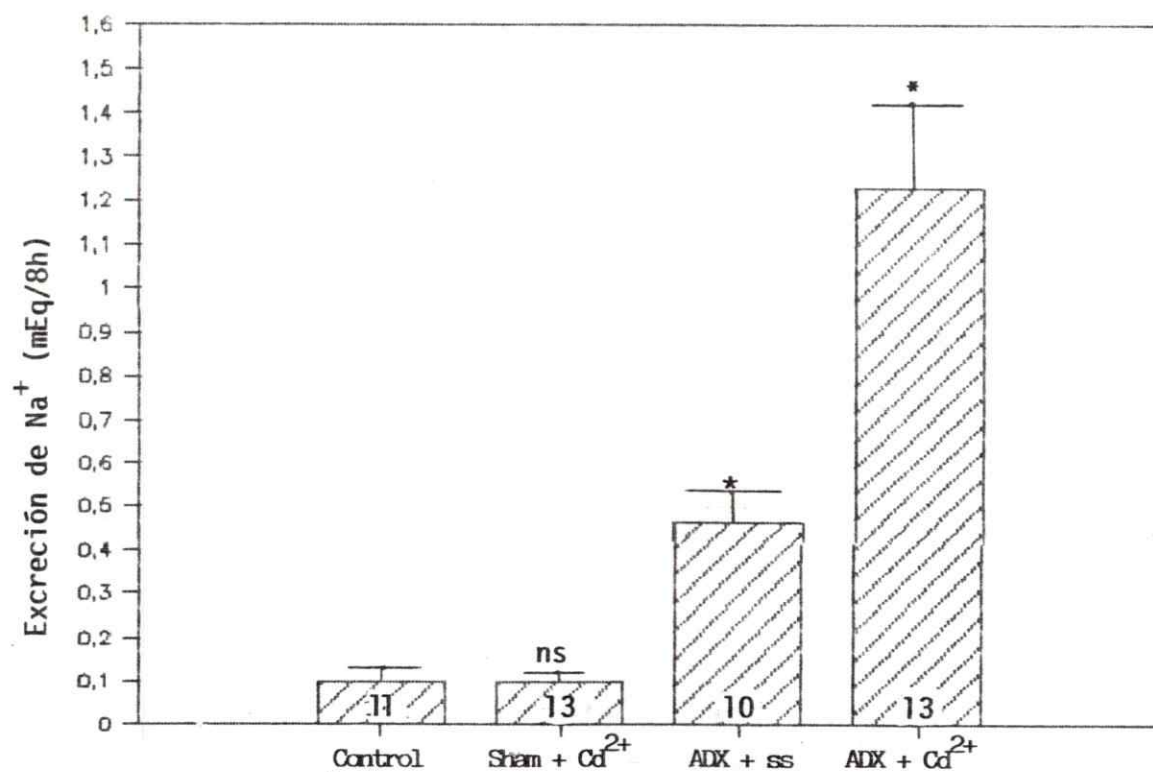


Fig. 3: Efecto de Cd^{2+} ($1 \mu\text{mol}/100 \text{ g p.c.}$) administrado i.p. sobre la excreción de Na^+ de la rata.

Los resultados (promedios \pm E.S.) están expresados en mEq/8h.

Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativo ($p < 0.05$)

ns: no significativo

A.2.2. EXCRECION DE POTASIO

Los valores para la excreción de potasio de los grupos Control, Sham + Cd²⁺, ADX + s.s. y ADX + Cd²⁺ se muestran en la figura 4 y estan resumidos en la tabla 1. En ellos se puede observar una disminución de la excreción de potasio equivalente a un 77% para el grupo ADX + s.s., valor que resulta significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Por otra parte, los valores de excreción de potasio observados en los otros grupos equivalen a un 32% para el grupo Sham + Cd²⁺ y un 13% para el grupo ADX + Cd²⁺, valores que no son significativamente diferentes comparados con el grupo control.

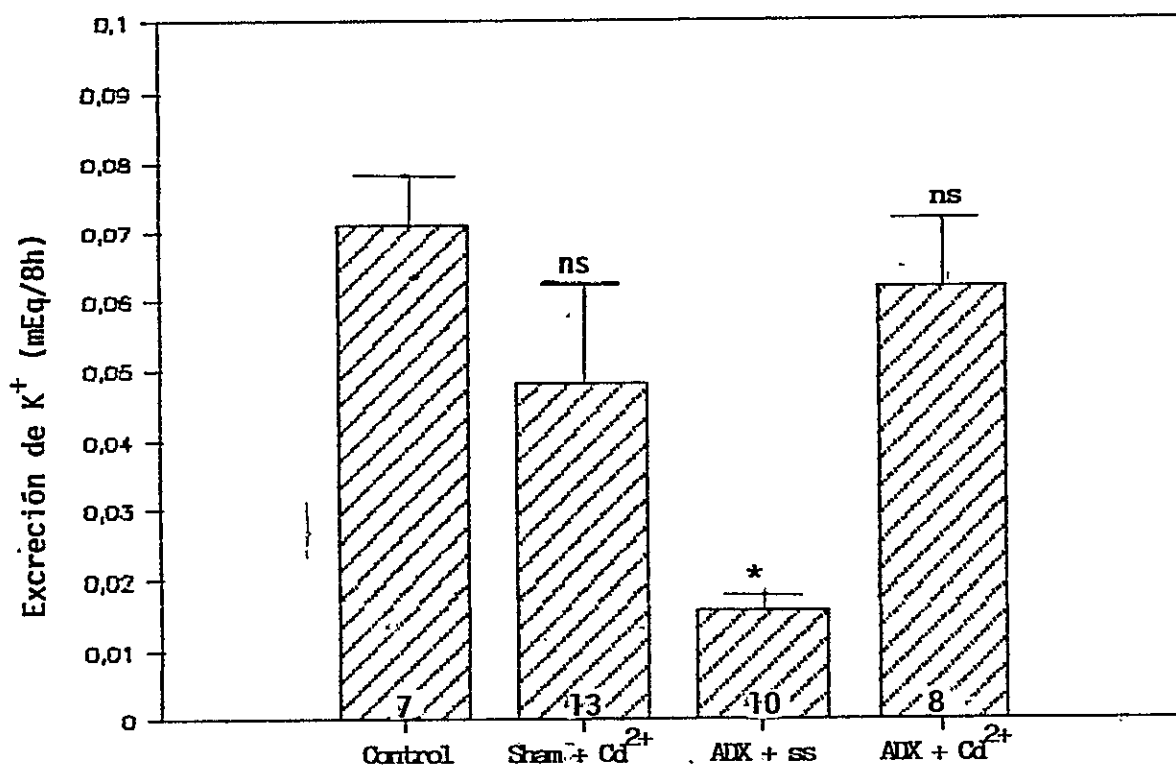


Fig. 4: Efecto de Cd²⁺ (1 μ mol/100 g p.c.) administrado i.p. sobre la excreción de K⁺ en la rata.

Los resultados (promedio \pm E.S.) están expresados en mEq/8h.

Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativo ($p < 0.05$)

ns : no significativo.

A.2.3. EXCRECION DE CLORURO

Los valores de excreción de cloruro de los grupos Control, Sham + Cd^{2+} , ADX + s.s. y ADX + Cd^{2+} se muestran en la figura 5 y se resumen en la tabla 1. Se puede observar un ligero aumento de la excreción de cloruro en todos los grupos, comparados con los valores del grupo control, pero solamente el grupo ADX + Cd^{2+} presenta un aumento significativamente diferente comparado con los valores del grupo control ($p < 0.05$).

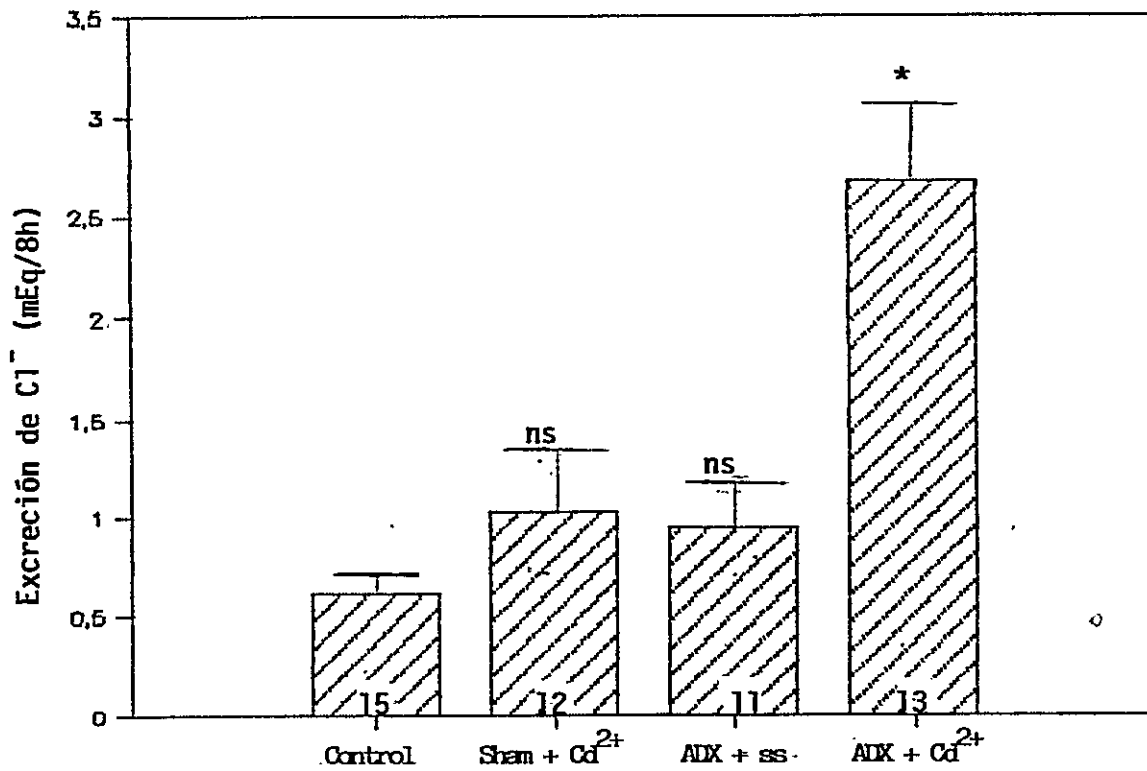


Fig. 5: Efecto de Cd²⁺ (1 μmol/100 g p.c.) administrado i.p. sobre la excreción de Cl⁻ de la rata.

Los resultados (promedios ± E.S.) están expresados en mEq/8h. Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativo ($p < 0.05$)

ns : no significativo.

A.3. ELECTROLITOS EN EL PLASMA

Los niveles de sodio , potasio y cloruro plasmático se encuentran resumidos en la tabla 2. En ella se puede observar que las concentraciones de estos iones en animales de los diferentes grupos experimentales no difieren significativamente con respecto a los valores del grupo control.

TABLA 2. Efecto de Cd^{2+} ($1 \mu\text{mol}/100 \text{ g p.c.}$) administrado i.p. sobre las concentraciones plasmáticas de Na^+ , K^+ y Cl^- en la rata.

Tratamiento	Concentración de electrolitos (mEq/l)		
	Na^+	K^+	Cl^-
Control	(7) $164.6 \pm 3.1\#$	(7) 4.6 ± 0.7	(7) 105.0 ± 2.1
Sham + Cd^{2+}	(10) 151.2 ± 3.7	(10) 4.1 ± 0.8	(10) 90.6 ± 3.8
ADX + S. S.	(8) 160.1 ± 3.3	(8) 6.2 ± 1.3	(7) 102.0 ± 2.1
ADX + Cd^{2+}	(8) 159.5 ± 2.9	(8) 3.2 ± 0.1	(8) 99.6 ± 3.2

Los simbolos siguen la terminología indicada en la TABLA 1.

A.4. CUANTIFICACION DE VOLUMEN SANGUINEO

Los valores de hematocrito, volumen plasmático y volumen sanguíneo se resumen en la tabla 3. Se puede observar que los animales tanto del grupo ADX + s.s como del grupo ADX + Cd²⁺ presentan una disminución significativa ($p < 0.05$) del volumen sanguíneo expresado por 100g p.c. comparados con los valores del grupo control, mientras que los valores promedios de volumen sanguíneo del grupo Sham + Cd²⁺ comparados con los del grupo control no presentan diferencia significativa. Por otra parte, las determinaciones de hematocrito muestran que existe aumento significativo ($p < 0.05$), solamente en el grupo ADX + s.s., comparado con el grupo control.

TABLA 3. Efecto de Cd^{2+} (1 $\mu\text{mol}/100$ g p.c.) administrado i.p. sobre volumen plasmático, hematocrito y volumen sanguíneo de la rata.

TRATAMIENTO	PESO (g)	HEMATOCRITO %	VOLUMEN PLASM. (ml/100 g p.c.)	VOLUMEN SANGUINEO (ml/100 g p.c.)
Control	(10) 233 \pm 5.5#	(10) 46.8 \pm 0.9	(10) 3.6 \pm 0.5	(10) 6.9 \pm 0.40
Sham + Cd^{2+}	(10) 221 \pm 5.7	(10) 46.2 \pm 2.0	(10) 4.0 \pm 0.5	(10) 6.7 \pm 0.20
ADX + S.S.	(10) 231 \pm 4.8	(10) 51.2 \pm 0.9*	(10) 2.2 \pm 0.1*	(10) 4.5 \pm 0.08*
ADX + Cd^{2+}	(10) 231 \pm 7.0	(10) 47.1 \pm 0.9	(10) 3.0 \pm 0.3	(10) 5.7 \pm 0.20*

Los símbolos siguen la terminología indicada en la TABLA 1.

A.5. EVALUACION DE METALOTIONEINA DE LOS CUATRO GRUPOS

Las concentraciones de metalotioneína en hígado y riñón en los grupos de ratas estudiadas se resumen en las figuras 6 y 7. En ellas se observa un incremento de los niveles de metalotioneína equivalente a 10.4 veces para el grupo Sham + Cd²⁺ y de 4.7 veces para el grupo ADX + Cd²⁺ a nivel hepático con respecto al grupo control, siendo estos valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). A nivel renal también se observó un aumento de esta proteína, equivalente a 11.2 veces para el grupo Sham + Cd²⁺ y de 7.8 veces para el grupo ADX + Cd²⁺, comparado con el grupo control, siendo estas diferencias de concentración estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En cambio, los niveles de metalotioneína encontrados en el hígado y riñón en el grupo ADX + s.s. no fueron significativamente diferentes con respecto a los valores del grupo control.

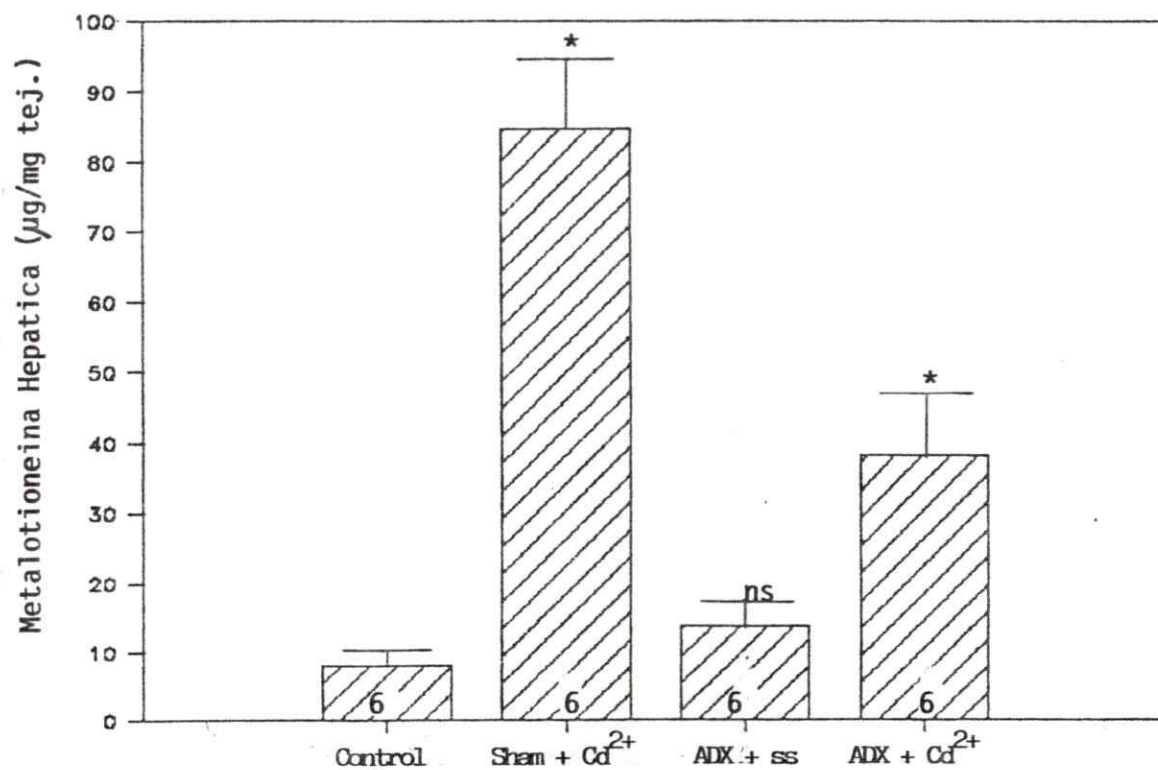


Fig. 6: Efecto de Cd²⁺ (1 µmol/100 g p.c.) administrado i.p. sobre la inducción de Metalotioneina hepática de la rata.

Los resultados (promedios ± E.S.) están expresados en ug/mg de tejido.

Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativo (p < 0.05)

ns : no significativos

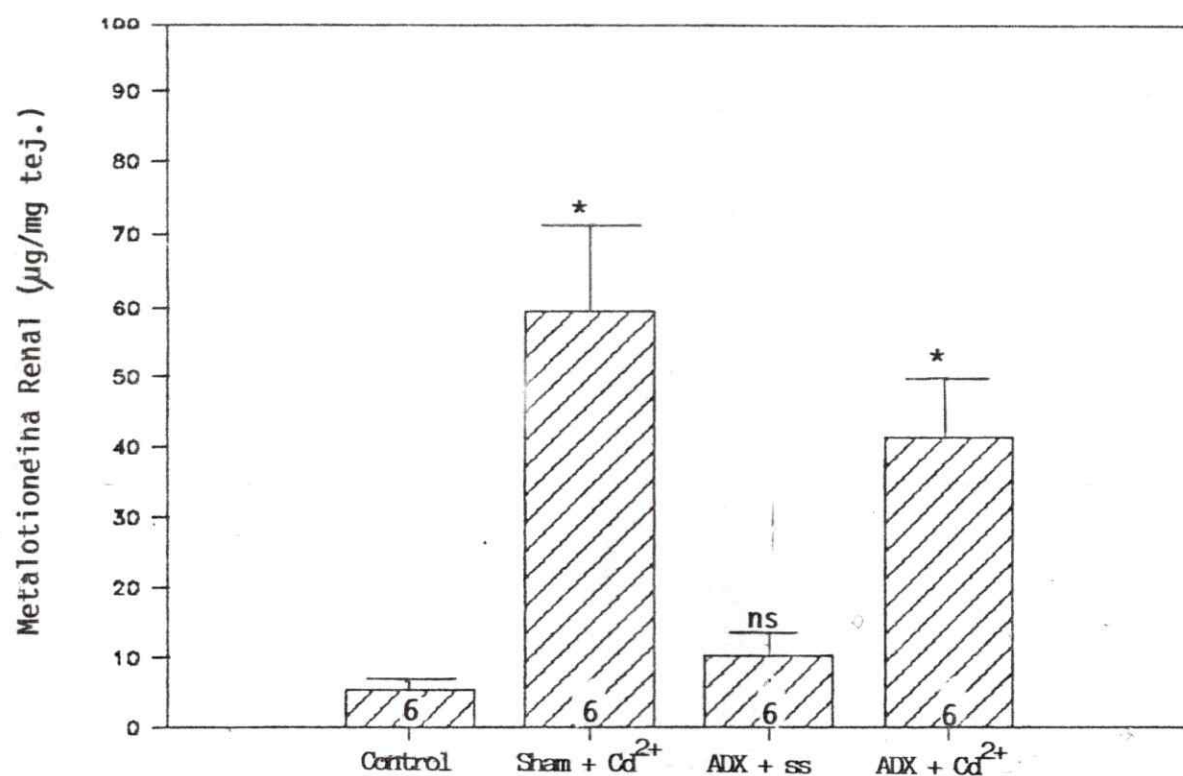


Fig. 7: Efecto de Cd²⁺ (1 µmol/100 g p.c.) administrado i.p. sobre la inducción de Metalotioneína Renal de la rata.

Los resultados (promedios ± E.S.) están expresados en ug/mg de tejido.

Los números dentro de las barras representan el número de experimentos.

* : significativos (p < 0.05)

ns : no significativo

B. ESTIMACION DE REACTIVIDAD VASCULAR

Los cambios de tensión desarrollados por los trozos de arteria mesentérica se resumen en las tablas 4 y 5. En ellas se consignan las variaciones de tensión, expresadas como cambios de área bajo la curva, para los ensayos con N-Epinefrina y Angiotensina II, en presencia o ausencia de cadmio. Se observa que no existen diferencias significativas, cuando se comparan las tensiones desarrolladas antes y después de agregar cadmio al medio de incubación. Sin embargo, al comparar las tensiones desarrolladas en presencia de Angiotensina II sola con aquellas donde ésta estuvo combinada con cadmio, se observó un incremento de dicha tensión. Un efecto similar fue observado en los ensayos con N-Epinefrina sola o combinada con cadmio. En este contexto, podemos observar que la tensión desarrollada se incrementó 3.6 veces al agregar Angiotensina II, en ausencia de cadmio, mientras que el aumento de la tensión para la misma hormona en presencia de cadmio fue de 7.6 veces, siendo ambos valores significativamente diferentes comparada con la tensión basal ($p < 0.05$). En los resultados obtenidos con N-Epinefrina, se puede observar que la presencia de cadmio también produce un incremento de la tensión desarrollada, equivalente a 2.4 veces, mientras que en ausencia del

tóxico el valor encontrado fue de 1.8 veces, siendo ambos valores significativos comparada con la tensión basal ($p < 0.05$).

TABLA 4. Cambios de tensión (variación de área) en trozos de arterias mesentérica inducidos por Cd^{2+} ($1.0 \mu\text{mol/ml}$ de solución) antes y después de administrar N-Epinefrina ($0.2 \mu\text{g/ml}$ de solución).

Tratamiento	Variación de área (cm^2)	Area (cm^2)	Incremento N° de veces	N
Antes NE	14.8	$12.7 \pm 2.2\#$	1.9^*	8
Después NE	27.4			
Antes de Cd^{2+}	15.1	1.1 ± 0.5	1.1 ns	8
Después de Cd^{2+}	16.2	23.2 ± 1.1	2.4^*	8
Después de $\text{Cd}^{2+} + \text{NE}$	39.4			

N : Número de experimentos

: Los resultados representan el valor promedio \pm el S.E. de las variaciones de tensión expresados como cambios de área bajo la curva (cm^2).

* : Promedios significativos ($p < 0.05$).

ns : Valores no significativos.

TABLA 5. Cambios de tensión (variación de área) en trozos de arterias mesentérica inducidos por Cd^{2+} ($1.0 \mu\text{mol/ml}$ de solución) antes de y después de administrar Angiotensina II (1.0 ng/ml de solución).

Tratamiento	Variación de área (cm^2)	Area (cm^2)	Incremento N° de veces	N
Antes Ang. II	15.3			
		$39.3 \pm 0.9\#$	$3.6 *$	10
Después Ang. II	55.2			
Antes de Cd^+	15.6			
		1.3 ± 0.8	1.1 ns	10
Después de Cd^{2+}	16.9			
		112.3 ± 4.0	$7.6 *$	10
Después de $\text{Cd}^{2+} + \text{Ang II}$	129.2			

N : Número de experimentos.

: Los resultados representan el valor promedio \pm el E.S. de las variaciones de tensión expresados como cambios de área bajo la curva (cm^2).

* : Promedios significativos ($p < 0.05$)

ns : Valores no significativos.

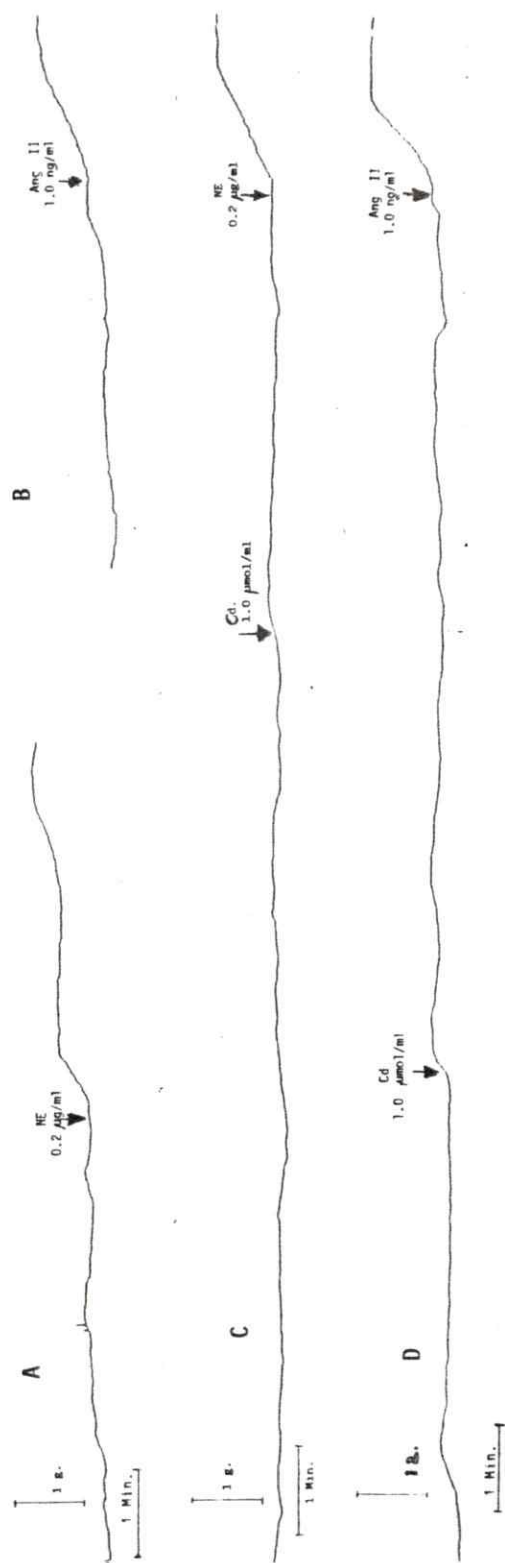


Fig. 8: Algunas respuestas típicas de los trozos de arteria mesentérica a Cd^{2+} ($1 \mu\text{mol/ml}$) antes o después de la administración de N-Epinefrina ($0.2 \mu\text{g/ml}$) o Angiotensina II (1.0 ng/ml). Las flechas indican la administración de drogas.

A y B : Corresponden a los cambios de tensión al agregar N-Epinefrina o Angiotensina II en ausencia de Cadmio.

C y D : Corresponden a los cambios de tensión al agregar N-Epinefrina o Angiotensina II en presencia de Cadmio.

DISCUSION

Entre los diferentes mecanismos propuestos como explicación para el alza de presión arterial observado en animales expuestos a cadmio, se encuentran la inhibición de la excreción de sodio (Perry et al., 1971; Fulke, 1974) y el aumento de la reactividad vascular (Perry and Yunicc, 1965; Thind et al., 1970; Pilati et al., 1982). Respecto del primer mecanismo, se ha postulado que dicha inhibición se produciría en forma indirecta a través de la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Sin embargo, no existen estudios donde este sistema se encuentre ausente o interrumpido, para observar el efecto que tiene el cadmio sobre aquellos mecanismos directos que tienen relación con los procesos de reabsorción de sodio. De ahí que, se realizó la eliminación de las glándulas adrenales como una manera de descartar el efecto de sistema renina-angiotensina-aldosterona y evaluar la acción directa que el cadmio pudiese ejercer sobre los parámetros en estudio.

El segundo mecanismo propuesto para explicar el aumento de presión arterial, dice relación con los cambios de reactividad vascular frente a la acción del cadmio. Al

respecto, se ha propuesto que este ión produciría un aumento de la reactividad vascular (Perry and Yunice, 1965; Thind et al., 1970; Pilati et al., 1982), lo que afectaría directamente la resistencia periférica y consecuentemente la presión arterial. No existen evidencias significativas que indiquen una acción directa de este metal pesado sobre la actividad de la musculatura lisa de vasos sanguíneos. Por lo tanto, se consideró necesario estudiar el efecto que el cadmio pudiese tener sobre la actividad muscular en vasos sanguíneos aislados, al ser estimulados por drogas vasoactivas tales como N-Epinefrina y Angiotensina II.

CADMIO Y PRESION ARTERIAL SISTOLICA La presión arterial sistólica medida en los animales del grupo control no difiere de los valores promedios esperados para esta especie, el mismo hecho se constata al comparar nuestros valores de presión arterial de las ratas adrenalectomizadas con los reportados por Friedman et al., (1984). La administración intraperitoneal de cadmio en dosis de 1.0 $\mu\text{mol}/100\text{g p.c.}$, produce a las 48 horas, un aumento de la presión arterial sistólica equivalente a un 20% en los animales del grupo Sham + Cd^{2+} , un 18.6% para el grupo Intacto + Cd^{2+} y un 11.6% para los individuos del grupo ADX + Cd^{2+} , comparado con los valores del grupo

control. Estos resultados concuerdan con las observaciones de otros autores realizadas en ratas intactas de diferentes cepas que al ser expuestas a cadmio, aumentan su presión arterial sistólica (Perry et al. 1971; Piscator, 1964; Dhanian e Iwai, 1980). Sin embargo, los valores absolutos observados en este trabajo en los grupos intactos + Cd^{2+} y Sham + Cd^{2+} , son ligeramente superiores a los valores obtenidos por Perry et al., (1976) y por Schroeder et al. (1962). En efecto, se observa que dicho aumento de presión arterial sistólica final resulta ser un 17% mayor que los valores obtenidos por los autores mencionados anteriormente. Esta aparente diferencia podría explicarse por el uso de animales anestesiados en los dos trabajos anteriores, mientras que en este trabajo el registro de presión arterial se realizó en animales sin anestesia. En relación a este punto, se sabe que los anestésicos, en general, deprimen la actividad del sistema nervioso central, afectando por consiguiente la función cardíaca. A pesar de esta diferencia, es importante hacer notar que aquellos grupos que estuvieron expuestos a cadmio, incrementan su presión arterial sistólica.

BALANCE DE ELECTROLITOS Una de las hipótesis de este trabajo referente al efecto hipertensor del cadmio es que este sería capaz de inhibir la excreción de sodio, lo que llevaría a una retención de agua, traduciéndose en un aumento de la volemia y por lo tanto, en un aumento de la presión arterial. La disminución de la excreción de sodio podría explicarse de dos maneras: el cadmio afecta directamente el fenómeno de reabsorción de sodio renal (Vander, 1962), o un efecto estimulador de la liberación de renina (hormona renal) que conlleva un aumento de la secreción de aldosterona y por tanto retención de sodio (mecanismo indirecto), (Perry et al. 1971; Fulke, 1974). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la excreción de sodio, potasio y cloruro medidos en el grupo control no difieren de los valores esperados para esta especie (Utt et al., 1989). Sin embargo, los valores promedios de excreción de sodio observados en los grupos ADX + s.s. equivalen a 4.6 veces y 12.3 veces en ADX + Cd²⁺ comparado con los valores promedios del grupo control. Al comparar los valores de excreción de sodio entre los grupos ADX + s.s. y ADX + Cd²⁺, se observa que en este último grupo, existe un aumento de la excreción de sodio equivalente a 2.7 veces. Estos resultados sugieren que cadmio estaría afectando la función renal, probablemente, actuando sobre los mecanismos que regulan la reabsorción de sodio. Los valores aumentados de

excreción de sodio observado en el grupo ADX + Cd^{2+} podría deberse a un efecto inhibitorio del cadmio sobre la $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa a nivel renal, efecto similar a lo observado por Iturri y Peña (1983) en $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa de intestino delgado de ratas.

Los valores de excreción de sodio encontrados en el grupo Sham + Cd^{2+} no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Este hecho podría significar que en este grupo, junto con producirse la inhibición de la $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa a nivel renal, pudiese activarse, paralelamente, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Perry et al., 1971; Fulke 1974), de tal manera de compensar la excreción excesiva de sodio, producto de la inhibición de la $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa renal.

Por otra parte, si la retención de sodio aumenta, este incremento producirá cambios en la osmolaridad del plasma, lo que provoca retención de agua como mecanismo homeostático para compensar esta alteración, produciendo cambios en la volemia. En relación a este punto, los valores de volumen sanguíneo medido en el grupo control no difieren de los valores promedios esperados para esta

especie (Friedman et al., 1984). Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa de los valores promedios de volumen sanguíneo en los individuos de los grupos ADX + Cd²⁺ y ADX + s.s., comparados con los valores promedios obtenidos con los animales del grupo control. Este fenómeno se puede explicar, satisfactoriamente, debido a que el sodio es osmóticamente activo y por lo tanto capaz de arrastrar agua a nivel tubularrenal, produciendo una disminución del volumen sanguíneo (Ganong, 1982). El volumen sanguíneo observado en el grupo Sham + Cd²⁺, no difiere con respecto al valor promedio del grupo control. Dado que estos animales (Sham + Cd²⁺) tienen intactas las glándulas adrenales, disponen de todos los mecanismos antinatriuréticos funcionales. Esto significaría que el sistema renina-angiotensina-aldosterona se encuentra activado, compensando de esta manera el efecto natriurético del cadmio, tal como se observa en el grupo ADX + Cd²⁺.

CADMIU Y REACTIVIDAD VASCULAR La segunda hipótesis que se ha planteado en esta tesis, sostiene que el incremento de la presión arterial se produce por un aumento de la reactividad vascular inducida por la presencia de cadmio. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que preparaciones de trozos de arteria mesentérica aislada

(in vitro), presentan un aumento de la tensión frente a N-Epinefrina o Angiotensina II, tensión que aumenta cuando estos trozos estaban expuestos a dichas drogas en presencia de cadmio. Las evidencias experimentales de otros autores son contradictorias en relación a este punto. Por ejemplo, Perry et al. (1967), encontraron que al perfundir arterias aorta de la porción abdominal de rata con una solución que contenía cadmio ($1.6 \times 10^{-6} M$), producía un aumento de la presión arterial de hasta un 15%. Por otra parte, Golden (1975), y Ihind et al., (1970), encontraron que el cadmio producía una disminución de la capacidad de contracción en trozos aislados de arterias aorta de la porción abdominal de conejo, frente a N-Epinefrina o Serotonina.

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que cadmio produjo un efecto potenciador de la acción de la N-Epinefrina y de Angiotensina II. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Perry et al., (1967), quienes sugieren que cadmio produce un aumento de la reactividad vascular a agentes presores lo que aumenta la resistencia en las arterias mayores y por ende aumenta la presión arterial.

METALOTIONEINA

En relación a la determinación de niveles de metalotioneina, los resultados obtenidos muestran un aumento de esta proteína a nivel hepático y renal. Lo observado concuerda con otros autores (Kito et al. 1982; Suzuki et al., 1983), los cuales han demostrado que esta proteína es capaz de ligar metales pesados y acumularse en el hígado y en el riñón. El incremento a nivel renal de dicha proteína induciría un mayor daño a nivel de este órgano y por tanto, alteración de la homeostásis hidrosalina (Nriagu, 1981). De ahí que es importante evaluar los niveles de esta proteína, la que probablemente podría servir como un indicador del grado de exposición de un organismo o población a contaminantes ambientales.

En resumen, los resultados de esta tesis muestran que, existiría una relación entre el efecto del cadmio y la actividad del sistema vascular y renal, siendo especialmente notoria sobre la reactividad vascular, factor relacionado con la resistencia periférica y por tanto con la presión arterial. Respecto a la acción del cadmio sobre la función renal, se ha podido observar que este ión metálico favorece la excreción de sodio a nivel renal, siendo especialmente notorio en el grupo adreoprivo. Sin embargo, no existen pruebas suficientes que demuestren

este mismo efecto en el grupo Sham + Cd²⁺; por el contrario, pareciera que en este grupo prevalece el sistema renina-angiotensina-aldosterona como un mecanismo capaz de regular la excreción de sodio inducida por cadmio. Este hecho, en el largo plazo, podría afectar el balance de electrolitos plasmáticos, por una posible activación de este sistema y llegar así a constituir un factor capaz de inducir cambios en los niveles de electrolitos y de agua en el plasma y por consiguiente, una alteración de la presión arterial.

CONCLUSIONES

1. *Cadmio (1 $\mu\text{mol}/100\text{g p.c.}$) aumentó la presión arterial sistólica final en un 20% en el grupo Sham + Cd^{2+} , en un 18.6% en el grupo Intacto + Cd^{2+} y en un 11.6% en el grupo ADX + Cd^{2+} comparado con la presión sistólica final del grupo control.*
2. *En los animales adrenoprivos se observó un aumento de la excreción de sodio comparado con el grupo control, mientras que cadmio (1 $\mu\text{mol}/100\text{g p.c.}$) aumentó la excreción de sodio en el grupo ADX + Cd^{2+} comparado con el grupo ADX + s.s.*
3. *No se encontró diferencias significativas en los niveles plasmáticos de sodio, potasio y cloruro, en ratas inyectadas con cadmio comparadas con ratas del grupo control.*
4. *Se encontró una disminución significativa del volumen sanguíneo en los animales de los grupos ADX + Cd^{2+} y ADX + s.s. comparado con los valores del grupo control.*

5. *Cadmio (1 µg/ml de solución) es capaz de potenciar el efecto de la N-Epinefrina y Angiotensina II sobre la musculatura lisa de los vasos sanguíneos produciendo un aumento de tensión.*

6. *Los niveles de metalotioneína aumentaron en forma significativa en el hígado y en el riñón en los animales expuestos a cadmio, con respecto a los del grupo control.*

BIBLIOGRAFIA

- Axelsson, B. and Piscator, M. (1966) "Renal damage after prolonged exposure. Renal effects by cadmium" Arch. Environ. Health. 12, 360-373.*
- Berman, L. (1980) "Toxic metals and their analysis". Heydel International topic in science L.C. Tomas. Chap 9.*
- Bohr, D. F.; Boulet, P.L. and Taquini, A.C. (1961) "Direct tension recording from smooth muscle resistance vessels from various organs". Angiol. 12:478-485*
- Brdicka, R. (1933) "Determination of protein for an electrochemical method" Collect. Czech. Chem. Commun. 5:112-128.*
- Cherian, M.; Boyer, K.; and Delaquerriere-Richardson, L. (1976) "Cadmium-Metallothionein-induced Nefropathy". Toxicol. Appl. Pharmacol 38:399-408.*
- Codex Alimentarius (1976) "Lista de dosis máximas de contaminantes recomendadas por la comisión Mixta FAO/OMS".*

Cornejo H. y Diaz, E. (1982) "Espectrofotometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito aplicada a la determinación de elementos traza en tejidos vegetales. Prospección Nutricional en Tamarugo (*Prosopis Tamarugo*, Phil)". Tesis de Grado. para optar al título de Químico Farmacéutico Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica. Universidad de Chile.

Exon, J. H.; Lamberton, J. G. and Kaller, L.D. (1977) "Effect of chronic oral cadmium exposure and withdrawal on cadmium residues in organs of mice" *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* 18: 74-76.

Fulke, J. (1974) "Effect of cadmium on Na^+ and K^+ excretion and action of hydrochlorothiazide in rat" *J. Pharm. Sci.* 63:563-566.

Friedman, S.; McIndoe, R, and Tanaka, M. (1984) " Na^+ transport and blood pressure in the adrenalectomized rat". *Am. J. Physiol.* 241: H902-H908.

Ganong, W. "fisiología Medica" Capítulo 21: págs : 316-325. Capítulo 38: págs: 560-577. Octava Edición. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.

Golden, R. (1975) "Effect of cadmium induced hypertension on several responses of smooth muscle" Ph. D. tesis University of Michigan.

Goodman, L. and Gilman, A. (1978) "Bases farmacológicas de la terapéutica". 5ª Ed. Editorial Médico Panamericana.

Hayashi, H.; Yazawa, J.; Use, Y.; Sato, I. and Ishikawa T. (1978) "Inhibitory effect of cadmium on the release of acetylcholine from cardiac nerve terminals". Jap. J. Physiol. 28:333-345.

Hitchcock S. E., Huxley H. E. Szent-Gyorgyi (1973) "Calcium sensitive binding of tropin to actin-tropomyosin: a two site model for troponinaction". J. Mol. Biol. 80:825-829.

Hobson, M.; Milhose, M., and Rajanna, B. (1986) "Effect of cadmium on uptake of Dopamine and N-Epinefrine in rat brain synaptosome" Bull. Environ. Contam. Toxicol. 37:421-426.

Hunsaker, W. (1965) "Determination of Evans blue in avian plasma by protein precipitation and extraction" Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120:747-749.

Huxley H. E. (1969) "The mechanism of muscular contraction" *Sci.* 164:1356-1358.

Iturri, S.; Peña, A. y Pino, C. (1983) "Transporte intestinal en mamíferos y aves: Inhibición por metales pesados" *Arch. Soc. Biol. Exp.* V 16(2) R-162.

Iturri, S. and Peña, A. (1986) "Heavy metal-induced inhibition of transport in the small intestine in vitro. Interaction with other ions". *Comp. Biochem. Physiol.* 84(C)2:363-368.

Kagaminori, S.; Watanabe, M.; Nakagawa, H. and Kawano, S. (1986) "Case-control study on cardiovascular function in female with history of heavy exposure to cadmium" *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36:484-490.

Kagi, H. and Valle, B. (1960) "Metallothionein: A cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex." *J. Biol. Chem.* 235:3460-3465.

Kito, H.; Tazawa, J.; Ose, Y.; Sato, T. and Ishikawa, T. (1982) "Formation of metallothionein in fish" *Comp. Biochem. Physiol.* 73(C)1:129-134.

Kito, H.; Iazawa, J.; Use, Y.; Sato, T. and Ishikawa, T.
(1982) "Protection by Metallothionein against cadmium
toxicity." *Comp. Biochem. Physiol* 73(C) 1:135-139.

Kopp, S.; Perry, H.; Glonek, T.; Erlanger, M.; Perry, E.;
Barany, M. and D'Agrosa, L. (1980) "Cardiac
physiologic-metabolic changes after chronic low heavy
metal feeding". *Am. J. Physiol.* 239: H22-H30.

Kopp, S.; Glonek, T.; Perry, H.; Erlanger, E. and Perry, E.
(1982) "Cardiovascular actions of cadmium at
environmental exposure levels" *Science* 217:837-838.

McLarter, J. and Koch, M. (1983) "Hepatic metallothionein
and resistance to copper in juvenils coho salmon
Comp. Biochem. Physiol. 74(C) 1:133-137.

Mertz, W. (1981) "The Essential Trace Elements". *Science*
213:1332-1338.

Nordberg, G.; Piscator, M. and Nordberg, M. (1971) "On
the distribution of cadmium in blood". *Acta Pharm. et
Toxicol.* 30:289-295.

Nriagu, J. U. (1981) "Cadmium in the environment". Part II Health effect. A Wiley-Interscience Publication Sons. New York.

Dhanian, E. and Iwai, J. (1980) "Etiological role of cadmium in hypertension in animal model" *J. Environ. Pathol. and Toxicol.* 3:343-351.

Ulfson, R. and Sim, K. (1979) "An electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothionein" *Analyt. Biochem.* 100:343-351.

Usuna, D. and Edds, G. (1982) "Toxicology of Aflatoxin B-1 Warfarin, and cadmium in young pigs: Clinical Chemistry and blood coagulation." *Am. J. Vet. Res.* 43: 1383-1394.

Utt, L.; Welch, W. ; Lorenz, J.; Whitescarver, S. and Kotchen, J. (1989) "Effect of salt deprivation on blood pressure in rats" *Am. J. Physiol.* 256: H1426-1431.

Palecek, E. and Pechan, Z. (1971) "Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse-polarographic technique" *Anal. Biochem.* 42:59-71.

Perry, H. and Yunice, A. (1965) "Acute pressor effect of intraarterial cadmium and mercury ions in anesthetized rats" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120:805-808.

Perry, H.; Guardarshaw, M.D. and Perry, E.F. (1976) "The biology of cadmium Symposium in trace elements" *Medical Clinics of North America.* 60(4) July.

Perry, H.; Erlanger, M.; Yunice, A. and Perry, E. (1967) "Mechanism of acute hypertensive effect of intraarterial cadmium and mercury in anesthetized rats" *J. Lab. Clin. Med.* 70:963-971.

Perry, H.; Perry, E. and Puryfay, E. (1971) "Antinatriuretic effect of intramuscular cadmium in rats" *J. Lab. Clin. Med.* 163:1240-1244.

Pery, M.; Perry, E. and Erlanger, E. (1980) "Possible influence of heavy metals in cardiovascular disease: Introduction and overview" *J. of Environ. Path. and Toxicol.* 4:195-203.

Pfeffer, J. Pfeffer, M. (1971) "Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats" *J. Lab. Clin. Med.* 78:957-962.

Pilati, Ch. Ewing, K. and Paradise, N. (1982) "Effect of cadmium on contractility and contraction in isolated heart muscle". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169:480-486.

Piscator, M. (1964) "On cadmium in normal human kidney together with a receptor on isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits" *Nord. Hygi. Tids.* 45:76-82.

Reddington, J.W.; Winge, D. R. and Fowler, B. A. (1981) "Long term turnover of cadmium metallothionein in liver and kidney following a single low dose of cadmium in rat". *Biochem. et Biophys. Acta.* 673:171-183.

Revis, N. (1978) "A possible mechanism for cadmium-induced hypertension in rat". *Life Sci.* 22:479-488.

Revis, N.; Zinsmeister, A. and Bull, R. (1981)
"Artherosclerosis and Hypertension induction by lead
and cadmium ions: An effect prevented by calcium
ion." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6494-6498.

Schroeder, H. (1964) "Cadmium hypertension in rats". *Am. J.
Physiol.* 207:62-66.

Schroeder, H. and Virton W. (1962) "Hypertension in rats
induced by small doses of cadmium" *Am. J. Physiol.*
202:515-518.

Selkurt, E. (1975) "Fisiologia" capitulo 18 págs: 366-370.
Editorial El Ateneo.

Shanbaky, I.; Borowitz, J.; and Kessler, W. (1978)
"Mechanism of cadmium and barium-induced adrenal
catecholamine release" *Toxicol. Appl. Pharm.* 44:99-
105.

Sokal, R. and Rohlf, F. (1969) "Biometry" Chap. 10 pp. 281-
329. *Editorial W. H. Freeman and Company. San
Francisco.*

Stander, R. W. (1966) "An approach to quantitative analysis of intrauterine pressure data" *Obst. Gynec.* 27:110-115.

Steel, R. y Torrie, J. (1985) "Bioestadística: principios y procedimientos" cap. 8 págs. 181-182. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill.

Suzuki, K. and Akitomi, H. (1983) "Difference in relative isometallothionein ratio between adult and larva of cadmium-loaded bullfrog *rana catesbiana*" *Comp. Biochem. Physiol.* 75(C) 2:211-215.

Suzuki, K.; Tanaka, Y. and Kawamura, R. (1983) "properties of Metallothionein induced by Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} in frog." *Comp. Biochem. Physiol.* 74(C) 1:133-137.

Thind, G.S.; Karreman, G. Stephan, K. and Blakemore, W. (1970) "Vascular reactivity and properties of normal and cadmium-hypertensive rabbits" *J. Lab. Clin. Med.* 76:560-568.

Van Berneveld, A. and Van Der Hamer, C. (1985) "Influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the uptake and deposition of Pb^{2+} and Cd^{2+} in mice". *Toxicol. Appl. Pharm.* 79: 115-120.

Vander, A. (1962) "Cadmium enhancement of proximal tubular sodium reabsorption" *Am. J. Physiol.* 202:1005-1007.

Wapnir, R.; Moak, S.; Lifshitz, F. and Teichberg, S. (1978) "Alterations of intestinal and renal function in rats after intraperitoneal injection of lead acetate". *J. Lab. Clin. Med.* 94:144-151.