

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



**BASES FISIOPATOLÓGICAS DE LA  
HIPERTENSIÓN ARTERIAL INDUCIDA POR  
PLOMO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

María de San Miguel Marques Vidas

Bajo la dirección del doctor

Alberto Barrientos Guzmán

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2067-6**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**BASES FISIOPATOLÓGICAS DE LA**  
**HIPERTENSIÓN ARTERIAL INDUCIDA POR**  
**PLOMO**

**TESIS DOCTORAL**

**Autora:** María de San Miguel Marques Vidas  
Licenciada en Medicina y Cirugía

**Director:** Alberto Barrientos Guzmán  
Doctor en Medicina

**Coodirectores:** Santos Casado Pérez  
Doctor en Medicina  
Antonio López-Farré  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Marzo, 2001**

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Alberto Barrientos Guzmán, Jefe del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, por la dirección de esta tesis así como por las enseñanzas recibidas a lo largo de todos estos años que incluyen tanto mi formación como nefrólogo como el inicio de mi actividad investigadora. Gracias por la confianza y apoyo demostrados.

Al Doctor Santos Casado Pérez, Jefe del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, y al Doctor Antonio López-Farré, Jefe del Laboratorio de investigación Cardiovascular e Hipertensión de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Ambos pusieron a mi disposición tanto sus numerosos y valiosos conocimientos en el campo de la nefrología e investigación cardiovascular, como la infraestructura necesaria para llevar a buen término un trabajo como este.

A Inmaculada Millás, técnico del Laboratorio de Investigación Cardiovascular e Hipertensión. Gracias a su experiencia y a su inmensa paciencia fue posible realizar los estudios en el animal de experimentación. Gracias también por la incondicional confianza expresada a lo largo de estos cuatro años.

A todos y cada uno de los becarios del Laboratorio de Investigación Cardiovascular e Hipertensión, Juan Antonio, Sandra, Ana, Elena, Lourdes, Marga, Mercedes, Trini, y un largo etcétera de gente encantadora que me enseñó gran parte de lo que sé en metodología experimental y colaboró activamente en los experimentos llevados a cabo.

A Elena Miravalles González y a Joaquín González Revaldería del Laboratorio de Bioquímica del Hospital de Getafe, por su excepcional colaboración en las determinaciones de plomo y litio.

A Antonio Cruceyra por su colaboración en las determinaciones analíticas.

A Ana Sánchez Fructuosocuyo trabajo recogido en la tesis doctoral “Nefropatía por plomo” sirvió de base para esta tesis, y a todos los médicos integrantes del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos, por las enseñanzas y apoyo recibidos.

A Jesús López Lafuente por su cariño, y paciencia.

Este trabajo se financió gracias a una beca de la Fundación Iñigo Alvarez de Toledo y a un Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social (FISS 00/0145).

Este trabajo ha sido realizado íntegramente en el Laboratorio de Investigación Cardiovascular e Hipertensión de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid con la colaboración del Laboratorio del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid.

# INDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- INTOXICACIÓN POR PLOMO	2
1.1. PLOMO: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS	3
1.2. FUENTES DE INTOXICACIÓN.	4
1.2.1. Exposición medio ambiental.	4
1.2.2. Exposición no laboral al plomo.	5
1.2.3. Exposición laboral al plomo.	7
1.3. METABOLISMO DEL PLOMO.	7
1.3.1. Vías de entrada en el organismo.	7
1.3.2. Distribución y eliminación.	8
1.3.3. Niveles aceptables de plomo.	8
1.4. INTOXICACIÓN POR PLOMO	9
1.4.1. Aguda	9
1.4.2. Crónica.	10
1.4.2.1. Cuadro clínico y fisiopatología	12
1.4.2.2. Acciones celulares	17
2.- ENDOTELIO VASCULAR	18
2.1. Características y propiedades	18
2.2. Sistema L-arginina, NO, GMPc.	24
2.2.1. Síntesis, metabolismo y mecanismos de acción del NO	26
2.2.2. Acciones fisiológicas y patológicas del NO.	29
2.2.3. Características de las NOS	30
2.2.3.1. eNOS	33
2.2.4. Guanilato ciclasa soluble vascular	37
2.3. Disfunción endotelial.	39
2.4. NO y metabolismo del sodio.	42
2.4.1. Localización de las NOS en el riñón.	42
2.4.2. Papel del NO en la fisiología renal y manejo renal del sodio	42
3. INTOXICACIÓN POR PLOMO Y SISTEMA NO/GMPc	46
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Estudios en el animal, procesamiento de muestras sanguíneas y urinarias.	52
1.1. Medición de presión arterial y peso corporal.	53
1.2. Determinaciones analíticas en sangre y orina	53
1.3. Plumbemia.	54
1.4. Actividad de renina plasmática.	54

2. Estudios de reactividad vascular.	56
3. Estudio de la relajación endotelio-dependiente: sintetasa endotelial de óxido nítrico	57
3.1. Expresión proteica de la eNOS.	57
3.2. Determinación de caveolinas.	58
4. Estudio de la relajación no dependiente de endotelio: guanilato ciclasa soluble vascular.	59
4.1. Actividad de la GCs vascular.	59
4.2. Expresión proteica de la GCs vascular.	60
4.3. Determinación del mRNA de la GCs vascular.	60
5. Método estadístico	63
<b>IV. RESULTADOS</b>	64
1. Estudios en el animal intoxicado	65
1.1. Presión arterial y peso corporal.	65
1.2. Parámetros renales.	68
1.2.1. Creatinina sérica y aclaramiento de creatinina.	68
1.2.2. Proteinuria y microalbuminuria.	70
1.2.3. Excreción urinaria de ácido úrico.	72
1.2.4. Manejo renal de sodio.	74
1.3. Plumbemia .	77
2. Estudios de reactividad vascular.	78
2.1. Relajación dependiente de endotelio.	78
2.2. Relajación no dependiente de endotelio.	80
3. Estudio de la eNOS.	83
3.1. Expresión proteica de la eNOS.	83
3.2. Expresión proteica de caveolinas.	84
4. Estudio de la guanilato ciclasa soluble vascular.	86
4.1. Actividad de la GCs.	86
4.2. Expresión proteica.	87
4.3. Determinación del ARNm de la GCs.	88
<b>V. DISCUSIÓN</b>	89
1. Plomo y presión arterial.	90
2. Plomo, manejo renal del ácido úrico y del sodio.	92
3. Disfunción endotelial y disfunción de la célula muscular lisa.	95
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	101
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	
104	

## **I . INTRODUCCIÓN**

## 1. INTOXICACIÓN POR PLOMO

El plomo (Pb) es un contaminante de origen industrial y los efectos que provoca tras exposición continuada han sido materia de debate en la medida en que un gran porcentaje de la población está en contacto con este tóxico; bien a través de la contaminación ambiental o bien en su medio laboral.

La relación entre la exposición al Pb y la aparición de enfermedad renal es un concepto clásicamente descrito en la literatura pero aún hoy existe cierta controversia sobre el papel de la intoxicación crónica por plomo como causa de insuficiencia renal crónica (IRC) <sup>1,2</sup>. Los primeros estudios realizados en trabajadores con exposición laboral a este metal, arrojaron resultados contradictorios<sup>3</sup>. Aún más inciertos fueron los primeros trabajos en población sin exposición laboral y sin historia de intoxicación aguda, llegando en algunos casos a plantear la posibilidad de que la insuficiencia renal crónica pudiera ser una causa de aumento de los depósitos corporales de plomo<sup>4</sup>. Uno de los trabajos más concluyentes a este respecto fue el realizado por Van de Vyver et al.<sup>5</sup> quien analizó los depósitos óseos de Pb de 153 pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis y 22 trabajadores expuestos a Pb encontrando que sólo un 5% de los pacientes con IRC tenían depósitos elevados de Pb en una tasa comparable a la de los sujetos con exposición laboral. En esta línea, Sánchez-Fructuoso et al.<sup>6</sup> estudiaron los depósitos de Pb en una población de pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis encontrando niveles normales de Pb en población con insuficiencia renal crónica de etiología conocida (glomerular, enfermedad poliquística y pielonefritis crónica), y niveles elevados en un 56% de los pacientes con IRC asociada a hipertensión arterial y/o gota. Este mismo grupo



estudió también un grupo de pacientes con función renal normal e hipertensión arterial catalogada como esencial encontrando un aumento de los depósitos de Pb en un 15% de este grupo.

En la actualidad y refrendado por los resultados obtenidos en experimentación animal que describiremos más adelante, se acepta un nexo causal entre la intoxicación crónica por plomo o saturnismo crónico y la aparición de hipertensión arterial, hiperuricemia - con o sin artritis gotosa-, y aparición de nefropatía; tríada conocida como nefropatía por plomo.

A continuación pasaremos a describir las características de este metal, las fuentes más habituales de intoxicación, y las características de la intoxicación crónica por plomo.

### **1.1. PLOMO: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS.**

El plomo, como constituyente natural de la corteza terrestre, está ampliamente difundido pudiéndose encontrar en el agua, suelo y vegetación. Es un metal muy utilizado debido a su bajo punto de fusión, maleabilidad y alta densidad, así como por su capacidad para formar aleaciones. El empleo industrial del plomo y de sus aleaciones con antimonio y estaño, se remonta a los tiempos más antiguos. De hecho, las escuelas de Hipócrates y Plinio ya describieron intoxicaciones profesionales provocadas por este metal.

El plomo puede encontrarse en el medio ambiente de tres formas:

**-Plomo metal:** sólo es tóxico cuando alcanza temperaturas próximas a los 500°C, emitiendo vapores. Estos vapores se oxidan rápidamente precipitando el plomo en forma de partículas que, dependiendo del peso y grado de humedad, quedarán suspendidas en el

aire durante más o menos tiempo hasta caer finalmente al suelo. Esta es la forma de contaminación ambiental más importante.

**-Derivados inorgánicos:**

\*Óxidos: -Minio ( $Pb_2O_4$ ) u óxido de plomo rojo, base de pinturas anticorrosivas.

-Litargirio ( $PbO$ ) o protóxido de plomo.

-Bióxido de plomo, utilizado como colorante amarillo.

\*Cromato de plomo, utilizado también como colorante amarillo.

\*Arseniato de plomo, componente de numerosos insecticidas.

\*Carbonato de plomo o galena, empleado en alfarería.

**-Derivados inorgánicos:**

\*Acetato de plomo: es muy soluble por lo que se absorbe fácilmente por vía digestiva. Se ha empleado como abortivo.

\*Tetraetilo de plomo: aditivo de la gasolina para aumentar su rendimiento.

\*Estearato de plomo: se usa para dar estabilidad y consistencia al plástico.

\*Naftenato de plomo: componente de grasas y aceites de uso industrial.

## **1.2. FUENTES DE INTOXICACIÓN.**

### **1.2.1.Exposición medio ambiental.**

La contaminación medio ambiental por plomo es un fenómeno en aumento, especialmente desde que se inició el uso de las gasolinas en la década de los 40<sup>7</sup>.

El plomo es liberado al medio ambiente a partir de fuentes naturales e industriales. Se estima que un billón de toneladas de Pb entran en la atmósfera cada año, contribuyendo

en un 70% el plomo derivado de las gasolinas. La combustión de la gasolina genera vapores en los que el plomo se encuentra principalmente en forma de partículas de un diámetro aproximado de 0.45  $\mu\text{m}$ , de modo que alcanzan fácilmente los alvéolos pulmonares<sup>8</sup>.

Las concentraciones de plomo ambiental en las grandes ciudades oscilan entre 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pudiendo alcanzar hasta 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en hora punta<sup>9</sup>. La CEE ha adoptado medidas para disminuir el contenido de plomo de las gasolinas. Este organismo también ha considerado una tasa máxima admisible de plomo en el ambiente de 2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , aunque el cumplimiento de esta normativa es dispar en los países integrantes de la CEE.

Diferentes estudios han encontrado una correlación lineal entre el plomo del aire y el plomo en sangre cuando las concentraciones en el aire se mantienen dentro del límite de la normalidad. Sin embargo, cuando las concentraciones de plomo en el aire ascienden, esta relación deja de ser lineal. Así, los valores de plumbemia considerados como normales obtenidos en zonas rurales pueden ser hasta 8 veces inferiores a los obtenidos en las grandes ciudades<sup>10</sup>.

### **1.1.2. Exposición no laboral al plomo.**

La forma de exposición no laboral más importante ocurre a través de la vía digestiva. Enumeramos a continuación las fuentes más importantes.

**\*Agua:** el agua de consumo es probablemente la mayor fuente de intoxicación<sup>11</sup>. El plomo en estos casos procede de las tuberías de conducción del agua o de los depósitos con revestimiento de plomo. La solubilidad del plomo en los sistemas de conducción está influenciada por varios factores como la acidez, la concentración de calcio y sales en el agua y el tiempo que haya permanecido estancada el agua dentro de estos sistemas. La

importancia de esta fuente es tal, que se han descrito zonas endémicas de saturnismo crónico<sup>12, 13</sup>. Además, el plomo contenido en las aguas de riego y deshecho puede contaminar los cultivos y, secundariamente, al hombre.

**\*Utensilios de cocina:** Muchos utensilios fabricados con barro contienen plomo. Cuando han sido cocidos a temperaturas bajas, este metal no se incorpora a la arcilla, lo que facilita que se libere con posterioridad. Además, algunos barnices utilizados en el esmaltado de cerámica contienen plomo. Cuando se introducen en ellos alimentos ácidos se produce liberación del plomo, provocando casos de intoxicación<sup>14</sup>.

**\*Bebidas alcohólicas:** es clásica la descripción de mayores tasas de plumbemia en sujetos alcohólicos, especialmente en aquellos que ingieren vino en grandes cantidades, probablemente por los recipientes donde se almacenan las uvas<sup>15</sup>. En EEUU, esta fuente de intoxicación tiene especial importancia debido al consumo de licores destilados de forma ilegal (Moonshine Syndrome)<sup>16,17</sup>. El plomo en estos casos proviene de los utensilios utilizados durante la destilación.

**\* Alimentos:** las frutas y legumbres pueden contaminarse tanto por el uso de insecticidas que contengan arseniato de Pb, o por estar próximas las zonas de cultivo a zonas industriales con emisiones de plomo. Generalmente este plomo se elimina fácilmente con el lavado de las frutas y verduras. También se han descrito intoxicaciones por plomo secundarias a la ingesta de caza (perdigones), leche, harinas y pescados y moluscos procedentes de ríos contaminados.

**\*Pinturas:** esta es una fuente de intoxicación en niños por su hábito de chupar todos los objetos a su alcance. Pueden encontrarse altas concentraciones de plomo en tebeos, embalajes de dulces y chicles, tizas, lápices de colores, etc.

**\*Otros:** se han descrito casos aislados de intoxicación provocada por cosméticos, afrodisíacos, heroína y cocaína.

### **1.1.3. Exposición laboral al plomo.**

Son múltiples las profesiones en las que existe exposición al plomo y no nos entretendremos en su descripción. Actualmente, gracias a la adopción de medidas cada vez más restrictivas respecto a las tasas admisibles de Pb en el aire y a las tasas admisibles de plumbemia en trabajadores, esta no es una causa frecuente de nefropatía por plomo en nuestro medio.

## **1.2. METABOLISMO DEL PLOMO.**

### **1.2.1. Vías de entrada en el organismo.**

El plomo puede ingresar en el organismo por vía digestiva, respiratoria y dérmica. La vía más frecuente de intoxicación en humanos es la digestiva. La absorción gastrointestinal de Pb es sólo de un 5-10%, salvo en niños donde puede alcanzar entre 30 y 50%<sup>18</sup>. El ayuno y el déficit de calcio, hierro o zinc, pueden aumentar la absorción intestinal de Pb haciendo que estos individuos tengan mayor susceptibilidad a la intoxicación por plomo<sup>8</sup>. El plomo así absorbido pasa al hígado donde es eliminado salvo cuando el aporte es importante (intoxicación aguda) o leve pero continuo (intoxicación crónica). La vía respiratoria es la más importante en las exposiciones laborales. Casi el 50% del Pb inhalado es absorbido, dependiendo fundamentalmente del tamaño de la partícula. La vía dérmica es rara y ocurre sólo en casos de exposición industrial, aunque también se ha descrito con algunos cosméticos naturistas<sup>19</sup>.

### **1.2.2. Distribución y eliminación.**

Desde el torrente circulatorio, el Pb se almacena en un primer compartimento constituido por riñón, hueso, pelo y dientes donde permanece aproximadamente una hora. Después pasa a los hematíes donde gran parte se une al grupo hemo de la hemoglobina. De forma relativamente rápida se va produciendo la transferencia desde los hematíes hacia el hueso<sup>20</sup>. La vida media del Pb circulante es un mes.

El plomo óseo puede almacenarse en dos compartimentos fisiológicamente distintos: un compartimento inerte con una vida media de décadas, y un compartimento lábil que está en equilibrio con el plomo presente en la sangre y en los tejidos blandos. La movilización del Pb óseo puede estar aumentada en situaciones como el embarazo o el uso de quelantes.

El Pb circulante se elimina vía renal. La excreción renal de Pb depende de la cantidad y duración de la exposición<sup>21</sup>. Parte del Pb filtrado en el glomérulo se reabsorbe en el túbulo utilizando un mecanismo no bien identificado, probablemente utilizando un transportador común para metales pesados<sup>22</sup>.

### **1.3.3. Niveles aceptables de plomo.**

En la actualidad se admite que niveles de plumbemia  $\geq$  a 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  se correlacionan con un aumento de morbilidad<sup>23</sup>, aunque en las normativas existentes en España al respecto se admiten tasas de plumbemia entorno a los 70  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en individuos expuestos en

el medio laboral, siendo admisibles tasa superiores (hasta 80 µg/dl) siempre que los niveles de protoporfirina en sangre no superen los 20 µg/g de hemoglobina, los niveles de ácido deltaaminolevulínico estén por encima de 6 UE y los niveles de ácido deltaaminolevulínico sean inferiores a 20 µg/g de creatinina (Orden Ministerial de 9 de Abril de 1986, BOE 24 Abril 1986).

Sin embargo, en los casos de exposición medioambiental las cifras de plumbemia no son un indicador fiable dado que la vida media de este metal en sangre es corta. Tanto los valores de plomo en hueso como el test de EDTA son los métodos diagnósticos de elección en los casos de sospecha de intoxicación subclínica y cuentan con la ventaja de ser capaces de detectar exposiciones antiguas a este metal. La determinación de plomo óseo es poco frecuente en la práctica clínica habitual, pero se admite que cuantías superiores de 14 µg/g de plomo en el material obtenido de biopsia transiliaca o un cociente plomo / calcio óseo superior a  $130 \times 10^{-6}$  es indicativo de intoxicación por plomo<sup>5</sup>. El test de EDTA es un método de estimación indirecta del plomo óseo que se basa en la capacidad de quelación y movilización de los depósitos óseos de plomo de esta sustancia. Este test no es válido en caso de insuficiencia renal moderada-severa y requiere una recolección de orina adecuada durante 72h. Valores de plomo en orina superiores a 600 µg/72h tras la administración de EDTA son considerados patológicos.

## **1.4. INTOXICACIÓN POR PLOMO**

### **1.4.1. Intoxicación aguda por plomo.**

Aunque se sale fuera de nuestro estudio, haremos una breve referencia al cuadro de intoxicación aguda por plomo. Este es un cuadro “florido” en cuanto a su expresión

clínica, que se caracteriza por anemia hemolítica, dolor abdominal intenso (cólico saturnino), y alteraciones neurológicas en forma de encefalopatía y/o neuropatía periférica. La alteración renal típica de este cuadro es una tubulopatía proximal o Síndrome de Fanconi que se caracteriza por aminoaciduria, fosfaturia y glucosuria. Los análisis histológicos renales revelan la presencia de cuerpos de inclusión en el túbulo proximal, y el sedimento urinario de estos pacientes suele presentar inclusiones intranucleares en las células tubulares descamadas<sup>24</sup>.

#### **1.4.2. Intoxicación crónica por plomo.**

Aunque ya en el siglo XVII empezaron a sospecharse los efectos nefrotóxicos de plomo, la primera descripción de la nefropatía por plomo en el mundo moderno fue hecha por Lancereaux en 1862 quién lo identificó como el agente causante de una nefropatía túbulointersticial<sup>25</sup>. Las lesiones renales del saturnismo fueron descritas por primera vez por Blackman en 1936<sup>26</sup> y en 1973 Emmerson estableció los criterios para el diagnóstico de nefropatía crónica por plomo: insuficiencia renal crónica lentamente progresiva, riñones de tamaño pequeño e historia de excesiva absorción de plomo, previa exclusión de otras causas de insuficiencia renal<sup>27</sup>.

Los estudios anatómo-patológicos realizados en humanos han arrojado poca luz sobre la patogenia de esta enfermedad, dado que han sido realizados en fases muy avanzadas de la misma donde los hallazgos son bastante inespecíficos. La biopsia renal en la nefropatía crónica por plomo muestra atrofia tubular y fibrosis intersticial con mínima respuesta inflamatoria. Los cambios arteriulares que aparecen en estas fases son indistinguibles de los que aparecen en la nefroangioesclerosis<sup>16</sup>. El estudio ultraestructural



muestra hinchazón mitocondrial y aumento de cuerpos densos lisosomales dentro de las células del túbulo proximal<sup>28</sup>.

Los modelos experimentales de intoxicación han aportado más conocimientos sobre esta patología. En general los hallazgos más significativos se localizan en las células del túbulo proximal, que parece ser la estructura diana, al menos en estadios iniciales, de la nefropatía por plomo.

Es típica la descripción de **inclusiones de cuerpos intranucleares** sin separación alguna del resto de la cromatina y que están formados por pequeños gránulos densos e irregulares superpuestos. Adoptan una tinción roja viva con el tricrómico de Masson y rosa con hematoxilina-eosina, teniendo un tamaño equivalente al doble de un nucleolo. Representan acúmulos proteicos ricos en grupos sulfidrilos que contienen plomo. No son específicos del riñón apareciendo también en osteoclastos y células de Swann. Se desconoce su significado aunque algunos autores han sugerido que representan un esfuerzo celular por secuestrar el tóxico<sup>29</sup>.

Otro hallazgo frecuente es las **inclusiones intracitoplásmicas**. Tienen un contorno perfectamente delimitado por una membrana, su tamaño es variable y contienen hierro. Aparecen también en patologías que cursan con hipersideremia y en el caso del saturnismo reflejan la alteración en la síntesis del hemo<sup>30</sup>.

Las anomalías mitocondriales varían desde la aparición de ligera hinchazón hasta franca hipertrofia. Estas anomalías son inespecíficas pudiendo aparecer en numerosas patologías que afectan al túbulo proximal<sup>24</sup>.

#### **1.4.2.1. Cuadro clínico y fisiopatología.**

La intoxicación crónica por plomo es una enfermedad que cursa clínicamente silente durante un largo periodo de tiempo. De hecho, cuando se manifiesta la hipertensión arterial, la hiperuricemia con o sin artritis gotosa y la insuficiencia renal, puede haber transcurrido un largo periodo de tiempo desde que cesó la exposición, factor que dificulta enormemente el diagnóstico de estos enfermos. Revisaremos a continuación los tres componentes de esta tríada típica conocida también como nefropatía por plomo, así como los conocimientos sobre su fisiopatología de los que disponemos hasta la fecha.

**A. Insuficiencia renal:** La nefropatía secundaria a la intoxicación crónica por plomo es muy poco específica en lo que a clínica se refiere. Aparece a menudo en pacientes con el diagnóstico previo de hipertensión arterial esencial de larga evolución, aunque en algunos casos la insuficiencia renal precede al diagnóstico de HTA. Se trata de una insuficiencia renal lentamente progresiva sin una semiología específica: no suelen presentar proteinuria o esta es ligera y tampoco existe aumento de la excreción de proteínas de bajo peso molecular como  $\beta_2$ -microglobulina. Se ha descrito un aumento en la excreción urinaria de aminoácidos y una reducción en el Tm de glucosa en estudios puntuales, en ocasión realizados sin grupo control<sup>31,32</sup>, y también se ha señalado la aparición de leucocituria o microhematuria inespecíficas.

El único rasgo que puede ser considerado como típico es la presencia de una alteración en la excreción renal de ácido úrico, como veremos más adelante. Ya hemos revisado las lesiones histológicas características de esta enfermedad, pero lo más habitual en estos pacientes es encontrar una histología indistinguible de la que presenta la nefroangioesclerosis de otro origen, con esclerosis glomerular, atrofia tubular, fibrosis intersticial y arteriosclerosis de los vasos presentes en el material analizado.

**B. Hiperuricemia y artritis gotosa:** La asociación de hiperuricemia e hipertensión arterial esencial es un hecho bien definido en la literatura, llegando a establecerse una prevalencia de hiperuricemia en pacientes hipertensos de 26-33%<sup>33</sup>. Sin embargo, ha sido en los últimos años cuando se ha sugerido que la hiperuricemia es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular<sup>34, 35</sup>. También es frecuente encontrar reflejada en la literatura la frecuencia de asociación de hiperuricemia y enfermedad renal, especialmente cuando esta última aparece unida a HTA. El significado fisiopatológico de esta relación se apoya en los siguientes hechos:

.-Los pacientes con HTA e hiperuricemia presentan un aumento de las resistencias vasculares renales, y la hiperuricemia se ha relacionado de forma directa con las resistencias vasculares renales y de forma indirecta con el flujo plasmático renal<sup>36</sup>.

.-La microalbuminuria en la HTA esencial traduce daño cardiovascular y se ha documentado una relación directa entre la presencia de microalbuminuria y los valores séricos de ácido úrico<sup>37</sup>.

.-La alteración hemodinámica renal precede al disturbio del metabolismo del ácido úrico en los pacientes con nefropatía familiar asociada a hiperuricemia<sup>38</sup>.

Así pues, la simple asociación de HTA y/o insuficiencia renal serían suficientes para justificar la presencia de hiperuricemia en pacientes con intoxicación crónica por plomo. Sin embargo, la incidencia de hiperuricemia y/o gota es inesperadamente alta en este grupo de pacientes como demostraron los estudios de Emmerson<sup>27</sup> en Australia o de Morgan et al<sup>16</sup> con el Moonshine syndrome.

Al igual que en el caso de la HTA esencial, la fisiopatogenia de la hiperuricemia en la intoxicación crónica por plomo es aún parcialmente desconocida. En ambos casos existe

una disminución de la excreción renal de ácido úrico que parece secundaria a un aumento de la reabsorción tubular del mismo. El transportador de aniones del túbulo proximal intercambia el A. úrico por radicales  $\text{OH}^-$  por un mecanismo acoplado a un transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ <sup>39</sup>. En el caso de la HTA esencial se ha demostrado que la disminución de la excreción renal de úrico está asociada a una disminución de la excreción renal de Na. La causa parece ser la hiperinsulinemia (secundaria a resistencia selectiva a la insulina) presente en algunos de estos pacientes. La insulina es capaz de estimular este transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , lo que facilitaría la reabsorción de aniones por el mecanismo anteriormente mencionado<sup>40</sup>. Nada se ha mencionado en la literatura en lo que se refiere a la hiperuricemia de la intoxicación crónica por plomo, aunque como veremos a lo largo de este trabajo, es muy probable que comparta al menos alguno de estos mecanismos patogénicos.

Por otro lado y como ya hemos mencionado, la hiperuricemia es por sí misma un factor de riesgo cardiovascular. Estudios recientes han encontrado una relación causal para este hecho basada en la capacidad de los iones superóxido derivados de la actividad de la xantina-oxidasa en condiciones de hipoxia o isquemia tisular para secuestrar los peroxinitritos y disminuir, secundariamente, los niveles de  $\text{NO}^41$ . Como explicaremos más adelante, uno de los mecanismos más invocados durante los últimos años en la génesis de la HTA en la intoxicación crónica por plomo, es una alteración en la vasorrelajación  $\text{NO}$ -dependiente. Aunque parece razonable pensar en un círculo causal que una todos estos factores, (disfunción vascular → alteración hemodinámica renal → hiperuricemia → disfunción vascular), hasta la fecha esto no se ha podido demostrar.

**C. Hipertensión arterial:** se han utilizado tres modelos de experimentación animal para el estudio de la hipertensión arterial y la nefropatía inducida por plomo.

.-Intoxicación con “altas dosis de Pb” (5000 ppm),

.-Intoxicación con “bajas dosis de Pb” (100 ppm),

.-Intoxicación ultra-baja (5ppm).

Las dos primeras remedan los niveles de plumbemia alcanzados en exposiciones laborales, y el último simula los niveles alcanzados en exposiciones ambientales<sup>42</sup>.

Los hallazgos observados en estos tres modelos experimentales difieren sustancialmente:

.-Los cambios histológicos parecen tener una relación dosis y tiempo-dependiente: el modelo de intoxicación ultrabaja logra los cambios tubulares típicos (descritos anteriormente en este texto), sin aparición de cambios vasculares o intersticiales importantes<sup>43</sup>, mientras que los de “altas dosis” logran que aparezca el cuadro histológico completo, si bien utilizan periodos de intoxicación más largos (9 vs 12 meses)<sup>44</sup>.

.-Los modelos de "alta dosis" provocan un fenómeno de hiperfiltración que aparece al tercer mes de intoxicación, seguido de un descenso del filtrado glomerular a partir de los 12 meses de exposición. Los estudios sobre la aparición de nefropatía en el modelo de intoxicación “ultra baja” no han sido tan exhaustivos, pero parece existir mínima afectación en lo que a creatinina plasmática y aclaramiento de creatinina se refiere<sup>45</sup>.

.-Los hallazgos más llamativos aparecen cuando se estudia la aparición de hipertensión arterial. Mientras que la elevación de la tensión arterial así como aparición de distintos marcadores de alteración en la relajación endotelio-dependiente aparecen ya al

tercer mes de intoxicación en el modelo de “baja dosis” (100ppm), no se aprecia modificación tensional alguna en los animales tratados con altas dosis de plomo (5000 ppm)<sup>46</sup>. Hasta la fecha no existen publicaciones sobre la aparición de HTA utilizando el modelo de intoxicación “ultra baja”.

Parece pues, que algunas de las alteraciones provocadas por este metal siguen un modelo dosis-dependiente, mientras que otras, - en concreto la génesis de hipertensión arterial-, tienen una relación inversa con la dosis de Pb administrada. Aunque parece razonable atribuir este hecho a la puesta en marcha de fenómenos vasodilatadores cuando se sobrepasa determinado grado de intoxicación, hasta la fecha no existen datos concluyentes sobre este punto.

Uno de los sistemas más estudiados en la génesis de la HTA inducida por plomo ha sido el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Los primeros resultados publicados, obtenidos en humanos, encontraban supresión de la actividad de renina plasmática en pacientes con saturnismo crónico de distintas etiologías<sup>47</sup>. Estudios posteriores realizados en ratas han confirmado la supresión de la actividad de renina plasmática así como la disminución de la renina renal y de la angiotensina II tras exposición a dosis bajas de plomo (100 ppm) durante tres meses<sup>48</sup>. Hasta la década de los 90 no aparecen más datos en la literatura que aporten conocimiento sustancial sobre la fisiopatogenia de la HTA inducida por plomo. En la última década aparece un amplio número de estudios centrados en el sistema de relajación vascular NO dependiente que han aportado evidencia sobre la acción de este metal a nivel molecular. Dado que estos trabajos forman parte sustancial del fundamento de esta tesis, este tema será desarrollado con posterioridad.

#### **1.4.2.2. Acciones celulares.**

El plomo actúa como tóxico en gran variedad de funciones biológicas comunes a múltiples órganos y sistemas. El mecanismo íntimo de acción del plomo más conocido es la inhibición de enzimas mediante la unión a sus grupos sulfidrilo. El mejor ejemplo de ello son los trastornos que produce en la biosíntesis del grupo hemo por inhibición de la ALA-deshidrogenasa y de la ferroquelatasa; pero también interfiere en otros sistemas enzimáticos como la fosforilación oxidativa y el metabolismo energético mitocondrial. En este sentido, se ha demostrado disminución en la actividad de un grupo numeroso de fosfatasas hepáticas en modelos experimentales de intoxicación crónica por Pb<sup>49</sup>.

En el caso de la ALA-deshidrogenasa, se ha demostrado mediante estudios de difracción anómala con múltiples longitudes de onda, que el Pb, al igual que otros metales pesados como Hg o Pt, altera la actividad enzimática modificando la estructura cuaternaria proteica<sup>50</sup>. En el caso de otras enzimas el mecanismo es desconocido, especulando en ocasiones con la posibilidad de que el plomo ejerza una inhibición competitiva con el sustrato.

## 2. ENDOTELIO VASCULAR.

### 2.1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES.

Las células endoteliales, en conjunto denominado endotelio, forman una monocapa que tapiza todo el sistema vascular. Son células poligonales alargadas que tienen multitud de vesículas pinocitósicas y forman complejos de unión con las células vecinas<sup>51</sup>. Contienen de forma característica cuerpos de Weibel-Palade: orgánulos unidos a la membrana donde se encuentra almacenado el factor de von Willebrand (vWF) o factor VIII, utilizado como marcador específico del endotelio.

El endotelio vascular está situado en un lugar anatómico estratégico, entre la sangre y la pared vascular, que le permite actuar como receptor y transmisor de señales. Los principios básicos de organización endotelial como son su situación, sus propiedades dinámicas de superficie y su especialización regional, tienen importantes consecuencias en lo que respecta a las funciones vitales de este tejido tanto en situaciones normales como patológicas. El endotelio vascular es un tejido multifuncional versátil que tiene multitud de propiedades y, entre ellas, destacan las que se describen a continuación:

- **Transducir las fuerzas biomecánicas.** Registra cambios hemodinámicos generados por la corriente sanguínea pulsátil como la presión o las fuerzas de cizallamiento, cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos, o modificaciones de los mensajeros químicos circulantes o procedentes de células vecinas y, en consecuencia, responde a esos cambios mediante la liberación de numerosos factores o transmite la señal a otros componentes de la pared vascular<sup>52</sup>.



- Constituir una **barrera de permeabilidad selectiva** entre la sangre y el espacio extravascular controlando la transferencia de moléculas por su tamaño y su carga eléctrica dentro de la pared, sobre todo allí donde el revestimiento endotelial es continuo (corazón y grandes arterias)<sup>53</sup>. Los glucosaminoglicanos sulfatados y otras especies cargadas del glucocalix endotelial pueden adsorber ciertas macromoléculas como factores del crecimiento y citoquinas. Por otro lado, pueden producirse cambios de permeabilidad en respuesta a estímulos fisiológicos y fisiopatológicos, aumentando en situaciones de inflamación y en respuesta a niveles elevados de lipoproteínas. Las células endoteliales oxidan lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las endocitan, formando parte de los elementos implicados en el desarrollo de placas arterioscleróticas<sup>54</sup>.

Además de las funciones estructurales del endotelio vascular, este tejido actúa como un órgano paracrino con las características que describimos a continuación:

- **Regular el equilibrio hemostático trombótico.** La célula endotelial es capaz de desempeñar varios papeles, tanto “pro” como “anti” hemostáticos/trombóticos que son esenciales para mantener la fluidez normal de la sangre, detener la hemorragia en lugares de lesión vascular e influir en la trombosis patológica<sup>55</sup>. Todo ello depende del mantenimiento del equilibrio entre la liberación de factores antitrombóticos y protrombóticos (tabla 1). En condiciones normales predominan las acciones antiagregantes y anticoagulantes, pero determinadas situaciones patológicas como la hipertensión arterial, dislipemias o diabetes se caracterizan precisamente por lo contrario.

**Tabla 1: Factores antitrombóticos y protrombóticos de origen endotelial**

ANTITROMBÓTICOS	PROTROMBÓTICOS
Oxído nítrico (NO)	Factor activador plaquetario
Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> )	Factor tisular
Trombomodulina	Factor von Willebrand
Activador tisular del plasminógeno	Inhibidor del activador del plasminógeno
Antitrombina III	Fibronectina
Ecto-ADPasa	Factor V de coagulación
Uroquinasa	

- **Mantener el tono vascular.** El endotelio participa en los fenómenos de vasoconstricción y vasodilatación mediante la síntesis y liberación de distintas sustancia vaso activas (tabla 2)

**Tabla 2: Sustancias vaso activas**

VASODILATADORES		VASOCONSTRICTORES
<i>Producidos por el endotelio</i>	<i>Actúan a través del endotelio</i>	
Adenosina	Acetilcolina (Ach)	Endotelinas
Factor hiperpolarizante derivado del endotelio	Histamina	Tromboxano A <sub>2</sub> (TX A <sub>2</sub> )
PGI <sub>2</sub>	Trombina	Leucotrieno E <sub>4</sub>
Leucotrieno D <sub>4</sub>	Bradiquinina	Angiotensina II (Ang II)
NO	Serotonina	Ión superóxido (O <sub>2</sub> )
Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )		

Al potente efecto vasodilatador del óxido nítrico (NO), se añade el de la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y el de otras sustancias vasodilatadoras que junto con las vasoconstrictoras regulan el tono del músculo liso vascular, la presión arterial y el flujo sanguíneo local<sup>56</sup>. Algunas de las sustancias arriba mencionadas han sido implicadas en la génesis de la hipertensión arterial provocada por plomo como ya hemos apuntado. Dedicamos más adelante un apartado al NO-endotelio dependiente, objetivo principal de esta tesis.

- **Regular el crecimiento y la migración de células adyacentes**, principalmente de células musculares, ya que secreta tanto factores promotores como inhibidores del crecimiento. En general, aquellos factores derivados del endotelio que tienen acción vasoconstrictora también poseen actividad proliferativa sobre las células musculares lisas vasculares (CMLV), mientras que los factores con acción relajante desarrollan una acción antiproliferativa sobre estas células, siendo el NO el principal agente antiproliferativo<sup>57</sup>.

Así, en aquellas situaciones en las que se observa una capacidad endotelial relajante reducida es frecuente encontrar proliferación de la capa muscular lisa. Existen algunos factores que poseen efectos variables sobre el crecimiento muscular dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas tal como el factor transformador del crecimiento  $\beta$  (TGF  $\beta$ )<sup>58</sup>.

**Tabla 3: Factores endoteliales reguladores del crecimiento de las CMLV**

Agentes proliferativos		Agentes antiproliferativos
Factor de crecimiento derivados de las plaquetas	Interleuquina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	NO
Factor de crecimiento básico de fibroblastos	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	TGF- $\beta$
Factor de crecimiento semejante a la insulina 1	Ang II	PGI <sub>2</sub>
Factor activador de plaquetas	Trombospondina	Heparina
TGF- $\beta$	Endotelinas	
Proteoglicanos : condroitín y dermatán sulfato		

- **Inhibir la agregación y la adhesión de distintas células sanguíneas a la pared vascular.** El endotelio sintetiza sustancias quimiotácticas y moléculas de adhesión que regulan la quimiotaxis de leucocitos y plaquetas, su adhesión a la pared vascular y la migración de los leucocitos al espacio extravascular donde desempeñan una función muy importante en los procesos inflamatorios próximos a la pared vascular<sup>59</sup>.

**Tabla 4: Factores quimiotácticos y moléculas de adhesión de origen endotelial**

<u>Factores quimiotácticos</u>	<u>Moléculas de adhesión</u>		<u>Inhibidores de la agregación y adhesión</u>
Factor estimulante de colonias	<i>-Célula endotelial-célula endotelial</i>		Oxido Nítrico
Factor activador de plaquetas	Cadherina del endotelio vascular	Selectinas E y P	Prostaciclina
Interleuquina 8	Molécula de adhesión endotelial plaquetaria	Inmunoglobulinas	
Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP1)	Integrinas	(ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1)	
	Ocludina	<i>-Célula endotelial-matriz extracelular</i>	
	Conexinas	Integrinas	

- **Ejercer funciones inmunológicas.** Las células endoteliales estimuladas con interferón-gamma expresan el complejo mayor de histocompatibilidad clase II funcionando como células presentadoras de antígeno. Esto provoca estimulación y unión de los linfocitos T a la célula endotelial, lo que a su vez provoca un aumento del calcio intracelular así como secreción de interleuquina-1 $\beta$ . Esto se traduce en un aumento de la fagocitosis de la célula endotelial así como de su respuesta a endotoxinas<sup>60</sup>.

Por todo esto, el concepto de endotelio vascular, considerado clásicamente como una simple barrera que separa la sangre de la pared vascular, ha cambiado de forma sustancial y en la actualidad es considerado como el principal órgano de regulación vascular con acciones exocrina, paracrina y autocrina, estando implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes<sup>61</sup>.

El correcto estado del endotelio resulta esencial en la fisiología vascular y su disfunción puede ser un factor crucial en la patogenia de la enfermedad vascular. El endotelio está implicado en la génesis y desarrollo de diversas patologías, como en los procesos vasculares de la hipertensión y arteriosclerosis, procesos inflamatorios e incluso neoplásicos y de diseminación de metástasis<sup>62</sup>.

## **2.2. SISTEMA L-ARGININA, NO Y GMPc.**

El mantenimiento del tono vasomotor se había considerado tradicionalmente una función exclusiva de las células musculares lisas hasta 1980 en que Furchgott y Zawadzky descubrieron que era necesaria la presencia de endotelio para producir la relajación in vitro inducida por Acetilcolina (Ach). Esta relajación endotelio-dependiente se atribuyó a una sustancia difusible liberada por el endotelio a la que se denominó factor relajante dependiente del endotelio (EDRF). Inicialmente se sugirió que el EDRF podría ser un factor lábil que participaba en las reacciones redox a pH fisiológico<sup>63</sup>, incluyendo la posibilidad de que fuera un radical libre derivado del metabolismo de ácido araquidónico<sup>63</sup>. El grupo de Ignarro sugirió en 1984 que el EDRF podía ser el óxido nítrico o un compuesto relacionado con el nitroiol<sup>64</sup> y en 1987 Palmer y cols.<sup>65</sup> identificaron definitivamente esta sustancia como óxido nítrico (NO). Además de la relajación

endotelio-dependiente, el NO realiza multitud de acciones fisiológicas gracias a las propiedades químicas y farmacológicas que posee (Tabla 5)

**Tabla 5: Características químicas y farmacológicas de NO**

**PROPIEDADES DEL ÓXIDO NÍTRICO**

- Es un gas inestable, con vida media entre 3 y 5 segundos.
- Tiene carga neutra y pequeño tamaño, lo que le permite una difusión libre y rápida a través de las membranas biológicas.
- Es un radical libre con un electrón desapareado que puede intervenir en reacciones redox.
- Reacciona con  $O_2$  y en presencia de  $H_2O$  da lugar a nitritos ( $NO_2^-$ ) o nitratos ( $NO_3^-$ ), cuya concentración en medios biológicos se utiliza para evaluar la generación de NO.
- Interacciona con el anión superóxido ( $O_2^-$ ) en solución acuosa y forma peroxinitrito ( $OONO^-$ ) que es un potente oxidante.
- Estable a pH ácido y en presencia de superóxido dismutasa (SOD)
- Tiene alta afinidad de unión con grupos sulfhidrilo (-SH) para formar S-nitrosotioles que son vasodilatadores y potentes inhibidores de la agregación plaquetaria.

### 2.2.1. Síntesis, metabolismo y mecanismos de acción del NO

Un número elevado de células posee la capacidad de sintetizar NO, entre las que se encuentran las células endoteliales y las células del músculo liso vascular<sup>66</sup>. El NO se genera mediante la conversión de L-arginina (L-arg) a L-citrulina<sup>67</sup> por la oxidación del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino de la L-arg, utilizando como enzima la óxido nítrico sintasa (NOS)<sup>68</sup>. En la reacción de síntesis del NO, se emplean como coostratos además de la L-arg, O<sub>2</sub> molecular y NADPH, actuando como cofactores el FMN, el FAD, el grupo prostético hemo y la tetrahidrobiopterina<sup>69</sup>, y generándose como metabolito intermediario la N<sup>0</sup>-hidroxi-L-arginina<sup>70</sup>. Dada la importancia de la L-arg para la formación del NO, las células que lo sintetizan poseen un transportador activo denominado y<sup>+</sup> que transporta aminoácidos catiónicos<sup>71</sup>.

Es importante resaltar que análogos estructurales de la L-arg, incluido su isómero, la D-arg, no actúan como sustrato para la síntesis de NO, y que incluso la inhiben, como es el caso del N<sup>G</sup>-monometil-L-arg (L-NMMA) o el N<sup>W</sup>-nitro-L-arg- metil ester (L-NAME)<sup>72</sup>. El L-NMMA actúa como inhibidor reversible, aunque la incubación prolongada puede inhibir de forma irreversible las NO sintasas, y además, compite con la entrada de L-arg; sin embargo, en determinados tejidos puede incluso metabolizarse a L-arg, pudiendo así estimular de forma paradójica la producción de NO. El L-NAME ejerce una inhibición irreversible y progresiva, posee un grupo guanido que le impide competir con la entrada de L-arg a través del transportador de membrana, y no puede ser metabolizado. Además, inhibe los receptores colinérgicos muscarínicos, lo que limita su utilidad como inhibidor in vivo<sup>70</sup>.



Para comprender mejor las acciones biológicas del aumento del NO se utilizan donadores de NO (como el S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, o SNAP, y el 3-morpholinosidonimina, o SIN-1), o un compuesto que se une al NO de forma estequiométrica y revierte los efectos del NO libre como es el carboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxyl 3-oxido (cPTIO)<sup>73</sup>.

La rápida difusión del NO entre las células es crucial para comprender su actividad biológica como mensajero intracelular y como modulador de acción local<sup>74</sup>. Este NO que difunde sufre tres reacciones principales: unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs) para estimular la producción de GMPc<sup>75</sup>, interacción con el anión superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ )<sup>76</sup>, y eliminación por reacción con oxihemoglobina ( $Hb-O_2$ ) hasta formar nitratos. Además, el NO sufre una serie de reacciones en soluciones oxigenadas con radicales libres de  $O_2$ , peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y en especial el anión superóxido ( $O_2^-$ )<sup>77,78</sup>. La toxicidad directa del NO es pequeña comparada con la del peroxinitrito formado a partir de él, ya que el peroxinitrito tiene elevado poder oxidante y capacidad de modificar residuos de tirosinas de proteínas<sup>79</sup>. Por otro lado, la propia actividad de las NOS genera anión superóxido que combina con el NO para formar peroxinitritos<sup>80</sup>. Según donde se dirija el NO liberado y el lugar de activación del GMPc, los efectos biológicos observados pueden ser diferentes. Por ejemplo, el aumento de GMPc en las CMLV da lugar a activación de quinasas dependientes de GMPc que producen una disminución en la concentración de calcio intracelular que conlleva la relajación; mientras que un aumento del GMPc en las plaquetas, debido a la liberación de NO al interior del vaso sanguíneo, disminuye la activación plaquetaria y la adhesión de las plaquetas al endotelio<sup>81</sup>.

Sin embargo, la diana más importante del NO en el sistema vascular es el grupo hemo de la GCs. Este enzima actúa principalmente en las células musculares de la media y cataliza el paso de GTP a GMPc, un segundo mensajero que regula la relajación del músculo liso<sup>82</sup>. Este segundo mensajero da lugar a la fosforilación de diferentes proteínas, la regulación de conductividad de canales iónicos y la activación de fosfodiesterasa II (PDE II), que transforma el AMPc en AMP. Otra fosfodiesterasa, la PDE III, además de catalizar el paso de AMPc a AMP, también regula la conversión de GMPc a GMP<sup>83</sup>.

El principal efector del GMPc en las CMLV es la proteín-quinasa dependiente de GMPc (PKG o quinasa G, isoforma tipo I). La PKG es relativamente específica de las CMLV, está presente en grandes cantidades. Esta quinasa puede fosforilar diversas moléculas en el interior celular, entre las que se encuentra la fosfolipasa C (PLC), para dar lugar a la relajación de las CMLV. La vasoconstricción se produce por la unión de diferentes vasoconstrictores a receptores de la membrana acoplados a proteínas G que activan la PLC para dar lugar al inositol trifosfato (IP3), inductor del aumento de calcio intracelular que trae consigo la contracción. La PKG, que solamente se activa en presencia de GMPc, actúa sobre esta transducción de señales, ya que produce el desacoplamiento de la PLC de los receptores, deteniendo así la señal de la contracción. De esta manera, el efecto vasodilatador del NO parece inhibir la vasoconstricción mediada por la vía de la PLC.

### 2.2.2. Acciones fisiológicas y patológicas del NO

El NO ejerce multitud de acciones fisiológicas sobre diversas moléculas, produciendo efectos muy variados, todos ellos de gran importancia en el correcto funcionamiento de diferentes órganos. Con el objeto de no extendernos en la descripción de todas las acciones del NO, a continuación las exponemos a modo de esquema:

1.-**Control del tono vascular:** el NO induce una vasodilatación rápida y transitoria de todos los tipos de vasos sanguíneos a través del mecanismo descrito anteriormente, por lo que es el principal vasodilatador endógeno<sup>84</sup>.

2.-**Produce la inhibición de:**

- la agregación plaquetaria,
- la adhesión plaquetaria,
- la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio vascular,
- el crecimiento y la proliferación del músculo liso vascular,
- la síntesis de proteínas de la matriz extracelular.

3.- **Defensa anti-infecciosa:** Los macrófagos generan grandes cantidades de NO que inhibe el crecimiento de distintos microorganismos.

4.- **Neurotransmisión:** a través de las terminaciones nitrérgicas regula diversas acciones en el aparato digestivo, sistema genitourinario y aparato respiratorio. Además, el NO que se produce en el sistema nervioso central participa en el olfato, la visión, la regulación de la ingesta, la coordinación y el equilibrio, y la memoria<sup>85</sup>.

### 2.2.3. Características de las NOS

Existen diferentes isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS). En la actualidad se han identificado tres isoformas, que se han denominado según el orden de purificación y aislamiento de su ADN: NOS I (conocida también como nNOS, originalmente identificada como constitutiva en tejido neural), NOS II (también conocida como iNOS, identificada por ser inducible por citoquinas en macrófagos y hepatocitos) y NOS III (o eNOS, originalmente indentificada como constitutiva en el endotelio vascular)<sup>86</sup>.

Todas las isoformas de NOS requieren tres sustratos para sintetizar NO, -L-arg, NADPH y O<sub>2</sub>-, y cinco cofactores o grupos prostéticos: FAD, FMN, calmodulina, tetrabiopterina y hemo<sup>69</sup>. Las NOS son moléculas homodiméricas de tamaño moderado (125-155 kDa cada monómero) y presentan una gran homología con la NADPH-citocromo P450 reductasa en su extremo carboxi-terminal. Todas las NOS presentan dominios similares de unión a NADPH, FAD, FMN, calmodulina, grupo hemo, L-arg y posiblemente también el de unión a tetrabiopterina. Se ha descrito que citoquinas tales como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  incrementan de forma marcada las concentraciones de tetrabiopterina, que es un cofactor limitante para la actividad de las NOS<sup>87</sup>. Por su parte, el propio NO es capaz de inhibir las NOS mediante mecanismos involucrados en la interacción con el grupo prostético hemo, siendo necesaria mayor cantidad de NO para inhibir la NOS inducible que la necesaria para inhibir las NOS constitutivas<sup>88</sup>. Además, las NOS pueden fosforilarse, lo que permite una regulación postranscripcional muy importante.

Las principales características de las tres isoformas de NOS se describen en la Tabla 6. En el apartado siguiente nos extenderemos en las funciones y forma de regulación de la eNOS por ser el objetivo de este trabajo.



**Tabla 6: Localización de las isoformas de NOS <sup>89 y81</sup>**

	nNOS	eNOS	iNOS
TIPO DE EXPRESIÓN	Constitutiva	Constitutiva	Inducible
LIBERACIÓN DE NO	Corta y pmolar	Corta y pmolar	Prolongada y $\mu$ molar
LOCALIZACIÓN EN EL ORGANISMO	Cerebro  Médula espinal Ganglios simpáticos Nervios nitrérgicos periféricos  Médula adrenal  Glándulas suprarrenales  Epitelio pulmonar, gástrico y uterino. Plaquetas Céls. pancreáticas  Músculo esquelético	Céls. endoteliales  Neuronas CMLV Plaquetas Neutrófilos megacariocitos Osteoblastos osteoclastos Fibroblastos Céls T y B Hepatocitos  Cardiomiocitos Testículos Placenta Ovario	Macrófagos  Céls. endoteliales CMLV Hepatocitos y y Neutrófilos  Células mesangiales  Células de carcinoma
LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	12q24.2 (29 exones)	7q35-7q36 (26 exones)	17cen-17q11.2 (27 exones)
TAMAÑO	155kDa	140 kDa	130 kDa

### **2.2.3.1. NOS III o eNOS.**

La eNOS es la única isoforma que posee un sitio de acilación donde pueden unirse ácidos grasos saturados que van a permitir su interacción con la membrana plasmática<sup>90</sup>. La acilación de la eNOS se produce de una forma dual por una N-miristoilación irreversible y una palmitoilación doble y reversible en su extremo N-terminal, lo que provoca la unión de eNOS a la membrana plasmática, particularmente con unas invaginaciones vesiculares denominadas caveolas, que se caracterizan por la presencia de proteínas transmembrana conocidas como caveolinas<sup>91</sup>. Además, la eNOS, - al igual que la nNOS -, interactúa con la calmodulina (CaM) sólo en respuesta al aumento de calcio intracelular. Representamos en la figura 1 los principales agonistas e inhibidores así como el mecanismo de acción de la eNOS.

**Figura 1: Mecanismos implicados en la actividad de la eNOS y vasorrelajación endotelio-dependiente.**

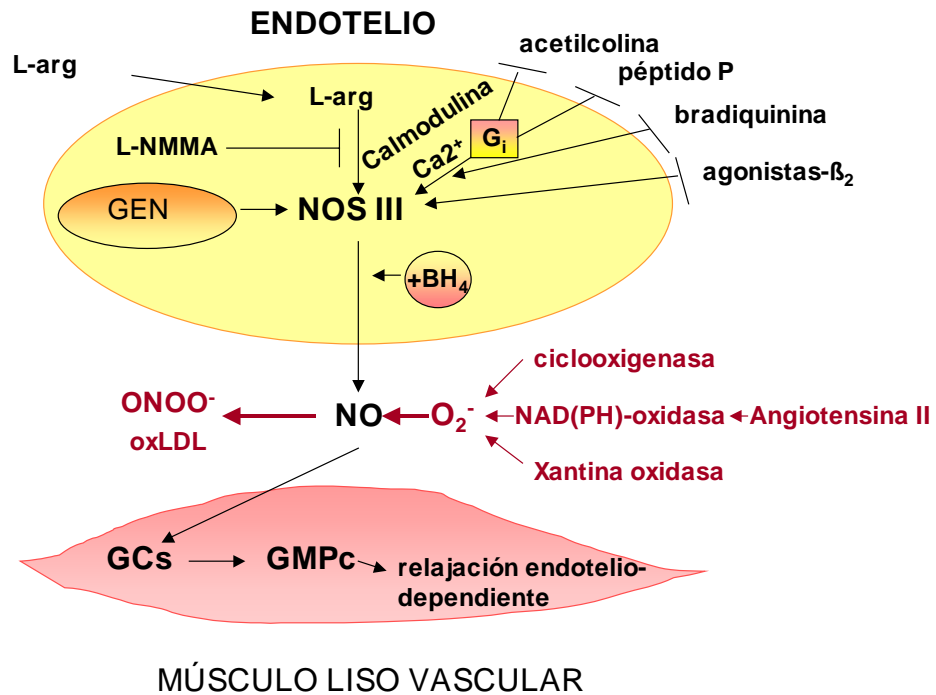


Figura 1: Mecanismos involucrados en la relajación endotelio-dependiente y endotelio-independiente. La eNOS, sita en el endotelio vascular, transforma L-arginina en NO por un mecanismo calcio-dependiente donde intervienen numerosos cofactores. El NO generado difunde a la célula muscular lisa estimulando la guanilato ciclasa soluble. Esta enzima transforma el GTP en GMPC. Este último provoca una disminución del calcio intracelular a través de la activación de la ATPasa de la membrana celular, induciendo relajación de las miofibrillas.

El grupo de T. Michel ha descrito que la interacción de eNOS a la membrana plasmática es debida a su gran afinidad por la caveolina. La interacción de eNOS con caveolina, mantiene a la enzima inactiva, mientras que cuando aumenta la concentración intracelular de calcio, la CaM desplaza la unión de la caveolina y activa la eNOS<sup>92</sup>. La



disminución de calcio intracelular da lugar a disociación de la CaM y eNOS y, por tanto, a la desactivación del enzima, ya que permite de nuevo su unión a la caveolina. También la demiristoilación y la fosforilación juegan un papel importante en la desensibilización del enzima. De hecho, Belhassen y cols. han demostrado recientemente en cardiomiocitos que la fosforilación de eNOS por la proteína quinasa A dependiente de AMPc, inhibe la palmitoilación del enzima y su translocación a la caveola<sup>93</sup>. En determinados tejidos, las caveolas pueden secuestrar moléculas de señalización e incluso es en este lugar donde se encuentran las proteínas G (como es el caso de los receptores muscarínicos m<sub>2</sub> y de la bradiquinina B<sub>2</sub>). Varios grupos de investigación han observado una activación mecánica de la eNOS independiente de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y sensible a cambios de pH intracelular y a la activación de tirosín quinasa, aunque las conclusiones de estos estudios no están del todo claras en cuanto a la fosforilación de la eNOS por tirosín quinasa<sup>94</sup>.

El NO procedente de la actividad de la eNOS se produce en el endotelio vascular bajo condiciones basales, y su liberación aumenta por el estrés que genera el rozamiento del flujo sanguíneo y por una gran variedad de agonistas con receptores específicos en el endotelio<sup>66</sup>. El NO liberado por la eNOS del endotelio vascular es un vasodilatador de enorme importancia y un inhibidor de la agregación plaquetaria y de su adhesión<sup>95</sup>. Además, el NO vascular previene la adhesión de los leucocitos al endotelio al reducir el complejo glicoproteico de adhesión leucocitaria CD11/CD18 y también se ha demostrado que inhibe la proliferación de las CMLV. Por todo ello, el NO procedente de eNOS se considera un factor anti-aterogénico, siendo la regulación de eNOS muy importante para la homeostasis vascular y para la comprensión de la fisiopatología vascular<sup>96</sup>.

Aunque la isoforma eNOS se describió inicialmente como constitutiva, durante los últimos años se ha demostrado que varios estímulos en diferentes células pueden modificar su expresión<sup>95</sup>. Por ejemplo, la práctica continuada de ejercicio, durante el crecimiento<sup>97</sup>, los estrógenos, el estrés de rozamiento, el FGFb y el TGF- $\beta$ <sup>98</sup> estimulan la expresión de eNOS. Sin embargo, la expresión de eNOS disminuye frente a estímulos tales como la hipertensión arterial, el LPS, el TNF- $\alpha$ , las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox)<sup>99</sup> y el incremento de AMPc<sup>93</sup>. Algunos de estos factores modulan la expresión de eNOS gracias a que en la región 5' de su ADN existen secuencias consenso de unión a factores de transcripción, como por ejemplo AP-1, AP-2, factor nuclear 1 (NF-1), NF-kB, y elementos de respuesta al estrés de rozamiento, a AMPc, a estrógenos y a INF-gamma entre otros<sup>95</sup>. Sin embargo, otros factores, en particular los que producen disminución de la eNOS, parecen regular la expresión de este enzima a través de la desestabilización de su ARNm<sup>95</sup>. Por ejemplo, las LDLox a altas concentraciones (100  $\mu$ g/ml) reducen los niveles de ARNm de eNOS de CEAB<sup>99</sup> y, en estas mismas células, se ha descrito en nuestro laboratorio que el TNF- $\alpha$  disminuye la vida media del ARNm de eNOS mediante la interacción de una proteína citosólica con una zona de la región 3' de este ARNm, de modo que este ARN no se traduce a proteína (3'-UTR)<sup>100</sup>. La menor producción de NO derivado del endotelio reduce la funcionalidad y la capacidad anti-aterogénica y antiinflamatoria de estas células, dando lugar a diferentes patologías cardiovasculares. Por tanto, estos mecanismos que reducen la expresión de eNOS contribuyen al desarrollo de patología cardiovascular. Debido a su importancia, estos aspectos serán tratados a continuación.

#### 2.2.4. Guanilato ciclasa vascular

El GMPc es un importante mensajero intracelular en varios tejidos. En las células musculares lisas vasculares (CMLV) su síntesis depende de las guanilato ciclasas, de las cuales se han descrito dos subtipos que a su vez presentan varias isoformas:

**-Membranosa:** pertenece a la familia de las tirosín quinasas y tirosín fosfatasas, de forma que presenta una porción transmembrana, un receptor en la superficie de la membrana mediante el que se une a los componentes de la familia del péptido natriurético atrial y a determinadas toxinas bacterianas<sup>101</sup>, y un dominio intracelular o catalítico que es el responsable de la síntesis de GMPc a partir de GTP. Hasta la fecha se han descrito tres isoformas de guanilato ciclasa membranosa, - GC-A, GC-B y GC-C-, que varían fundamentalmente en función del ligando de su receptor extracelular, y cuya función no está del todo aclarada<sup>102</sup>.

**-Soluble o GCs:** Es un heterodímero formado por una subunidad grande ( $\alpha$ ) y otra pequeña ( $\beta$ ), conteniendo ambas un grupo hemo en su estructura<sup>103</sup>. La GCs se activa por la unión a NO, radicales hidroxilo, monóxido de carbono, porfirinas y ácidos grasos poliinsaturados. La actividad basal de la GCs es hemo-independiente; sin embargo, la estimulación por NO requiere la formación de un complejo nitrosil-hemo<sup>104</sup>. Por ello, la unión de metales como zinc, cadmio o plomo al grupo hemo provoca la inactivación de la enzima<sup>105</sup>.

Se han clonado y secuenciado tres secuencias de ADNc que codifican la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) y otras tres para la subunidad  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ), sin que esté claro si representan

auténticas isoformas de la enzima o son simplemente variantes de especie<sup>106</sup>. Sin embargo, e independientemente de dichas variaciones, varios grupos han demostrado que, aunque ambas subunidades poseen un dominio catalítico, es necesaria la presencia de ambas para que la enzima presente actividad<sup>107</sup>.

El GMPc tiene dos funciones importantes en la fisiología vascular: es el mensajero intracelular de la relajación muscular NO-dependiente e inhibe la agregación plaquetaria<sup>108, 109</sup>. El NO generado por el endotelio es, probablemente, el activador endógeno más importante de la GCs y la actividad basal de la eNOS, y la respuesta de la GCs al NO así generado, es responsable del mantenimiento del tono vascular, de modo que cuando la eNOS se inhibe de forma farmacológica se produce un aumento de la tensión arterial<sup>110</sup>.

Todos los vasodilatadores exógenos que generan NO (p.ej. nitroprusiato sódico y trinitrato de glicerina), producen relajación del músculo liso vascular mediante activación de la GCs y aumento de la formación de GMPc. El GMPc disminuye la concentración intracelular de calcio provocando relajación de las CMLV a través de los mecanismos anteriormente descritos.

La investigación sobre la GCs y su papel en la homeostasis vascular, no ha sido tan intensa como es el caso del NO y las NO sintasas. Sin embargo, en los últimos años hemos asistido a un número creciente de publicaciones sobre el papel de esta enzima en distintas situaciones fisiológicas y patológicas. Entre las más relevantes para el tema que nos ocupa destacan las de Papapetropoulos et al.<sup>106</sup>, quien describe una disminución tanto de la transcripción como de la expresión proteica de GCs en presencia de agentes que promueven incremento del AMPc intracelular, con una disminución de la respuesta

vasodilatadora generada por dadores exógenos de NO o por activación de al eNOS. Dado que el AMPc también produce relajación de la CMLV, este fenómeno constituiría un mecanismo defensa encaminado a preservar el tono vascular. Bauersachs et al.<sup>111</sup> describen una disminución de la expresión proteica de GCs en la capa muscular de la aorta de ratas viejas espontáneamente hipertensas, junto con una disminución de la respuesta vasodilatadora frente a Ach y NPS, en ausencia de una alteración concomitante de la eNOS. En contrapartida, Cernadas et al.<sup>112</sup> encuentran un aumento en la generación de GMPc en respuesta a NPS en ratas Wistar viejas acompañado de una disminución de la actividad de la eNOS, lo que probablemente constituiría un mecanismo compensador frente una disminución de la capacidad del vaso para generar NO, gracias al cual la tensión arterial se mantiene dentro de los límites de la normalidad en estos animales.

### **2.3. Disfunción endotelial**

Como ya se ha indicado anteriormente, el endotelio está situado en un lugar estratégico, que le permite regular las actividades del músculo liso vascular y de las células sanguíneas. Dada su localización, el endotelio es además un blanco primario para el daño producido por las fuerzas dinámicas hemodinámicas y por las alteraciones humorales relacionadas con los factores de riesgo cardiovascular<sup>113</sup>. La situación provocada por estas alteraciones se denomina disfunción endotelial y no sólo debe considerarse como una consecuencia de los factores de riesgo cardiovascular, sino que además puede participar activamente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La disfunción endotelial afecta a la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas derivadas del endotelio, a la interacción del endotelio con los componentes de la sangre

circulante y de la pared vascular, y a las modificaciones estructurales y funcionales responsables del desarrollo de diferentes patologías asociadas a un mal funcionamiento del endotelio, tales como la hipercolesterolemia<sup>114</sup>, arteriosclerosis<sup>95</sup>, diabetes, hipertensión<sup>115</sup> e infarto agudo de miocardio<sup>116</sup>.

En modelos animales que reproducen la mayoría de estas patologías cardiovasculares e incluso en pacientes con arteriosclerosis, hipertensión o hipercolesterolemia, se ha demostrado una disminución en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducidas por Ach u otros agonistas<sup>117</sup>. También se ha observado falta de respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente en pacientes con arterias angiográficamente normales (sin signos detectables de arteriosclerosis), lo que parece indicar que el mal funcionamiento del endotelio es previo a la aparición de estas patologías cardiovasculares<sup>118</sup>. Esta falta de respuesta vasodilatadora podría deberse a efectos sobre la producción y la disponibilidad de NO por ser el vasodilatador más potente generado por el endotelio. De acuerdo con esta hipótesis, diferentes autores han sugerido que el mecanismo responsable de esta falta de respuesta vasodilatadora en patologías como la arteriosclerosis, se debe a una menor capacidad del endotelio para producir NO. La pérdida de NO derivado del endotelio contribuye principalmente a disminuir la relajación vascular<sup>113</sup>, aumentar la agregación plaquetaria<sup>119</sup>, promover la síntesis y expresión de factores pro inflamatorios (p.ej. citoquinas), incrementar la proliferación de CMLV<sup>120</sup> y favorecer la interacción de leucocitos con las células endoteliales, gracias al aumento de la expresión de moléculas de adhesión que atraen a las células inflamatorias a la superficie endotelial y facilitan su entrada en la pared vascular. Por otro lado, la inactivación del NO liberado por el endotelio por parte del anión superóxido, limita la disponibilidad del NO y

conduce a la vasoconstricción y a la hipertensión<sup>121</sup>. Por estas razones, la pérdida del NO impide al endotelio ejercer correctamente sus funciones, por lo que la disfunción endotelial podría definirse como una capacidad reducida del endotelio para producir y liberar NO<sup>118</sup>. Además, se ha demostrado que todos estos efectos producidos por la carencia de NO derivado del endotelio son comunes a los descritos en la disfunción endotelial<sup>122</sup>.

Existen numerosos factores de riesgo cardiovascular que causan disfunción endotelial y por tanto reducen la producción o disponibilidad del NO<sup>118</sup>. Además, la disfunción y la activación endotelial causadas por los factores de riesgo cardiovascular y los fenómenos inflamatorios vasculares, son las bases para el desarrollo de lesiones arterioscleróticas. La disfunción endotelial promueve la expresión de varias proteínas involucradas en la adhesión de leucos y plaquetas. El endotelio disfuncionante excreta la proteína quimiotáctica de monocitos, MCP-1, y el factor estimulante de colonias de macrófagos, M-CSF, que promueven la adhesión de monocitos a la pared del vaso y su consiguiente diferenciación a macrófagos, sucesos cruciales para el desarrollo de las células espumosas de las lesiones arterioscleróticas<sup>123</sup>. Otras moléculas de adhesión expresadas por el endotelio disfuncionante son la VCAM-1 o la E-selectina, que van a favorecer el contacto entre los leucos circulantes y el endotelio<sup>124</sup>. Las citoquinas, LDLox, y probablemente agentes infecciosos (CMV) o farmacológicos (Ciclosporina A), pueden provocar disfunción endotelial a través de mecanismos de oxidación y puesta en marcha de fenómenos inflamatorios<sup>113</sup>.

## **2.4. NO y metabolismo del sodio**

### **2.4.1. Localización de las NOS en el riñón.**

Los tres tipos de NOS han sido descritos en el parénquima renal.

La NOS I o neuronal ha sido descrita en la mácula densa y, en menor cuantía, en el túbulo colector, en el glomérulo, en la porción descendente del asa de Henle y en múltiples zonas de la vasculatura renal <sup>125</sup>. La NOS III o endotelial se ha descrito en el endotelio de las arteriolas renales y la NOS II o inducible se ha descrito también en el aparato yuxtglomerular, concretamente en la porción preglomerular de las arteriolas aferentes y en las células granulosas <sup>126</sup>.

#### **2.4.2. Papel del NO en la fisiología renal y en el manejo renal del sodio.**

- Hemodinámica cortical renal: En ratas se ha demostrado que dosis moderadas de L-NAME, administrado directamente en la arteria renal principal da lugar a un incremento sostenido de la tensión arterial con un incremento aún más importante de las resistencias vasculares renales, disminución del flujo plasmático renal y disminución de la resorción fraccional de sodio <sup>127</sup>. EL flujo cortical renal parece alterarse con mucha más facilidad al inhibir las NOS con L-NMMA que la tensión arterial, lo que indica que este territorio vascular tiene una regulación sustancialmente NO-dependiente. Por tanto, el sistema NO tiene una importancia crucial en el mantenimiento de la hemodinámica renal y en el balance electrolítico.

- Arteriolas glomerulares: Muchos de los trabajos recientes sobre el papel del NO en la fisiología renal se han centrado en la regulación local de las resistencias de las arteriolas glomerulares. Estudios de micropunción han revelado como el bloqueo de la producción de NO a este nivel provoca importantes cambios en la hemodinámica glomerular con aumento de la resistencia de la arteriola aferente sin modificaciones en el diámetro de la arteriola eferente especialmente cuando el estudio se lleva a cabo en las



nefronas de la corteza renal<sup>128</sup>. Sin embargo; en las nefronas yuxtaglomerulares, el L-NAME induce vasoconstricción de ambas arteriolas, aferente y eferente<sup>129</sup>. El mismo fenómeno ocurre con la sensibilidad de las arteriolas glomerulares aferente y eferente a la Angotensina II: en la corteza renal, la arteriola aferente es mucho más sensible a la ang-II que la eferente, mientras que en las nefronas yuxtaglomerulares no se observa esta diferencia<sup>130</sup>. La complejidad de la regulación de la hemodinámica glomerular se explica en parte por las diferencias funcionales de la corteza y médula renales. La circulación medular renal juega un papel fundamental en el balance de sodio y agua. En este lecho vascular parece existir una alta actividad del sistema NO, de modo que la infusión sistémica de L-NAME provoca una disminución del flujo sanguíneo renal sin alterar el flujo cortical, fenómeno que se acompaña de retención de sodio y elevación de la presión arterial sistémica<sup>131</sup>. Además de lo anteriormente expuesto, existe una interacción entre el sistema NO renal y el sistema renina-angiotensina aldosterona. El bloqueo de la producción de NO en el cortex renal potencia la capacidad vasoconstrictora de la angiotensina II en la arteriola aferente pero no en la eferente, sugiriendo que el NO endógeno modula de forma selectiva la acción de la angiotensina II sobre la arteriola aferente. En el modelo de Goldblatt de hipertensión vascularrenal (dos riñones-un clip) se ha demostrado la existencia de un aumento de la producción de NO que compensa el incremento en la producción de angiotensina II manteniendo de esta forma el flujo renal del riñón no clampado<sup>132</sup>.

-Feedback túbulo glomerular: Los estudios de Wilcox et al<sup>125</sup> revelaron como la generación local de NO podía inducir vasodilatación de la arteriola aferente y aumentar la presión de perfusión glomerular, y como este efecto era inhibido por furosemida.

Concluyeron de esta manera que la reabsorción tubular de solutos es capaz de activar la NOS de la mácula densa con la consiguiente generación de NO que sería el agente vasodilatador implicado en el feed back túbulo glomerular. En este sentido también se ha demostrado que la respuesta vasoconstrictora de la arteriola aferente que se genera en presencia de altas concentraciones de NaCl en la mácula densa está modulada por el sistema NO de esta última. Se especula con la posibilidad de que un aumento del calcio intracelular provocado por la activación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  es capaz de estimular la nNOS ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente) situada en la mácula densa. De hecho, se ha demostrado como la inhibición crónica selectiva de la nNOS a nivel de la mácula densa provoca un aumento de la sensibilidad del feed back túbulo glomerular disminuyendo el filtrado glomerular y aumentando el volumen circulante y la presión arterial <sup>133</sup>. Estudios recientes han demostrado que la acción del NO sobre el feed-back glomérulo-tubular está mediada por GMPc a través de la activación de la GCs sita en la mácula densa. El GMPc generado induce vasodilatación de la arteriola aferente a través de la activación de la proteína-quinasa dependiente de GMPc y consecuente disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, al igual que ocurre en la capa muscular vascular<sup>134</sup>.

-Fisiología tubular: múltiples estudios han reflejado el efecto del bloqueo de la síntesis de NO sobre la diuresis y natriuresis con resultados contradictorios, probablemente por el uso de distintos modelos experimentales. La inhibición aguda de las NOS provoca un aumento de la natriuresis como consecuencia de un incremento agudo de la tensión arterial. Sin embargo, la inhibición sostenida de la síntesis de NO provoca una disminución de la excreción renal de sodio y, de forma más tardía, hipertensión arterial<sup>127</sup>. El túbulo proximal es capaz de producir NO, y el ARNm de ambas NOS I y II ha sido

aislado en estas células. Además el túbulo contorneado proximal es una de las fuentes más importantes de arginina que probablemente sirve de sustrato para las NOS locales<sup>135</sup>. También en el túbulo colector el NO ejerce un efecto modulador de la resorción con disminución del transporte de solutos de forma paralela a la actuación del péptido natriurético atrial. De hecho, las células principales del túbulo colector son ricas en GCs que sería la efectora del sistema NO a este nivel<sup>136</sup>.

### **3. INTOXICACIÓN POR PLOMO Y SISTEMA NO/GMPc.**

Varios grupos han estudiado la aparición de alteraciones en los sistemas NO/GMPc implicados en la relajación y el mantenimiento del tono vascular en la intoxicación crónica por plomo, utilizando los modelos experimentales animales con distintas dosis de plomo. Resumimos a continuación los hallazgos más relevantes:

.-Kahlil-Manesh et al. describen un incremento de los niveles plasmáticos de endotelina 3 (vasoconstrictora), así como una disminución del GMPc en plasma y en orina, que interpretan como resultante de la acción del NO, en ratas intoxicadas con 100 ppm de Pb durante tres meses<sup>46</sup>. El mismo grupo estudió de forma paralela lo que ocurría en ratas intoxicadas con 5000 ppm de Pb, sin hallar alteración alguna en las cifras de endotelina 3 y de GMPc. Los autores interpretan estos resultados como una evidencia de alteración en la relajación endotelio dependiente en el modelo de baja dosis de Pb.

.- Vaziri et al. refieren un incremento en los productos de peroxidación lipídica acompañado de una disminución de los nitritos y nitratos urinarios en ratas intoxicadas utilizando bajas dosis de Pb. Estos hallazgos aparecen a las doce semanas de intoxicación de forma paralela a la aparición de hipertensión. Este grupo constata la desaparición de todos estos hallazgos cuando se administra un antioxidante (Lazaroid) al grupo intoxicado, infiriendo a la génesis de radicales libres de O<sub>2</sub> un papel fisiopatológico en la intoxicación crónica por plomo<sup>137</sup>.

.- El mismo grupo anteriormente referido, estudia de forma más detenida el sistema NO en el modelo de intoxicación con bajas dosis de Pb, encontrando un aumento en la expresión tanto de la eNOS, como de la iNOS, en aorta y riñón. Sin embargo, demuestran

disminución de la actividad de la eNOS en cultivo de endotelio expuesto a Pb. La interpretación que dan a estos resultados es la de una posible inhibición de la eNOS por el plomo, acompañada de un aumento de la expresión de esta enzima probablemente inducida por el shear stress que provoca la HTA<sup>138</sup>.

En suma; estos estudios indican la presencia de una alteración de la relajación dependiente de endotelio en la intoxicación por plomo, que se basa en una actividad disminuida de la eNOS a pesar de provocar una sobre expresión de la misma en la pared vascular. Además, la HTA inducida por plomo se relaciona con aumento de los radicales superóxido circulantes y con aumento de la peroxidación lipídica, con inactivación del NO previamente generado.

No existen estudios hasta la fecha centrados en el sistema de la guanilato ciclasa soluble vascular en esta patología, y aunque sí se ha demostrado que la exposición a plomo disminuye la excreción renal de GMPc, su significación es incierta (¿tubular, vascular?). Tampoco hemos encontrado publicaciones respecto a la génesis de la HTA en la intoxicación crónica por plomo utilizando el modelo de intoxicación “ultra-bajo”, que por otro lado es el que puede simular de modo más fehaciente lo que ocurre en la forma de intoxicación más frecuente en nuestro medio: la ambiental.

## ***II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis:** la intoxicación con bajas dosis de plomo provoca alteración de la relajación dependiente e independiente de endotelio.

Los **objetivos** de esta tesis se exponen a continuación.

1.- Analizar el modelo experimental de intoxicación ultra-baja (5ppm) en cuanto a su reproducibilidad con el cuadro observado en humanos, estudiando la evolución de los distintos marcadores de esta patología (función renal, excreción urinaria de ácido úrico y aparición de hipertensión), así como los valores de plumbemia alcanzados a lo largo de doce meses.

2.- Analizar el efecto de la intoxicación con bajas dosis de plomo sobre la funcionalidad endotelial, particularmente sobre el sistema NO/GMPc. Para ello estudiaremos:

.-Capacidad de relajación vascular in vitro inducida con agonistas de la eNOS y dadores exógenos de NO en segmentos de aorta de ratas intoxicadas. De este modo analizaremos la funcionalidad del endotelio y su capacidad de generación de NO, así como la funcionalidad del músculo liso vascular y su capacidad de respuesta frente al NO preformado.

.- Expresión proteica de la eNOS en la pared vascular de los animales tratados con plomo.

.- Expresión de la alfa-1 caveolina en la pared vascular de los animales expuestos a plomo dada la modulación que ejercen dichas proteínas sobre la actividad de la eNOS.

.- Guanilato ciclasa soluble vascular: analizaremos de forma pormenorizada la actividad basal a inducida, expresión proteica y síntesis proteica de este enzima en la pared

vascular de los animales tratados con plomo. De este modo pretendemos esclarecer el papel que ejerce la intoxicación por plomo sobre la relajación no dependiente de endotelio.



### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***

## **1. ESTUDIOS EN EL ANIMAL, PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y URINARIAS.**

Todos los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité Ético de la institución y fueron realizados de acuerdo con los reglamentos internacionales sobre la experimentación animal.

Los estudios se llevaron a cabo en ratas Wistar Kyoto, machos, de tres meses de edad, a las que se administró acetato de plomo, 5ppm, en el agua de bebida, con acceso libre a la misma, así como a la comida, utilizando una dieta standard. Un grupo de edad sirvió como grupo control.

En la primera parte del estudio, se intoxicó a las ratas a lo largo de 12 meses, con el objetivo de observar la evolución de la tensión arterial así como de distintos parámetros de función renal, como se detallará más adelante.

Para los estudios centrados en la génesis de la hipertensión arterial se eligió el periodo comprendido entre el inicio de la intoxicación y la aparición de una elevación significativa de la tensión arterial. Al final de dicho periodo, se anestesió a los animales mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (30 mg/k), y se procedió a extraer la aorta torácica. Las muestras destinadas a determinación proteica y extracción de RNA fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. El resto de la arteria fue procesada como se indicará más adelante.

### **1.1. Medición de presión arterial.**

Se determinó la presión arterial media (MAP) semanalmente hasta el primer mes, y mensualmente hasta el final de la intoxicación. Para ello, se utilizaron medidas indirectas en la cola del animal en estado consciente, utilizando un Narco-esfingomanómetro acoplado a un sistema informático de registro (Power Lab 400, AD Instruments, Casterhill, NSW, Australia). Se realizaron cinco medidas consecutivas con intervalos de un minuto.

### **1.2. Determinaciones analíticas en sangre y orina.**

Al final de cada periodo de estudio, los animales fueron introducidos individualmente en cajas metabólicas, con acceso libre al agua de bebida y a la comida. Se recogió la diuresis de 24 horas, al final de las cuales se extrajo 1.5 ml de sangre de la vena de la cola.

Las muestras de fueron inmediatamente centrifugadas, 25°C, 2500 rpm, 15 minutos; se separó el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su utilización.

Se determinó la concentración de sodio, potasio, ácido úrico, creatinina y urea en sangre; y los mismos parámetros más microalbuminuria y proteinuria en orina, utilizando un autoanalizador (OPERA Clinical Chemistry System # 5.27, Becton Dickinson Inc, Rutherford NJ).

Se utilizaron las fórmulas habituales para el cálculo del aclaramiento de creatinina, excreción fraccional de sodio y excreción neta de ácido úrico.

### **1.3. Plumbemia.**

Se determinó exclusivamente la concentración de plomo en sangre con el objetivo de verificar la reproducibilidad del cuadro de intoxicación ambiental en humanos. Para ello se obtuvieron muestras de sangre (1.5 ml con 250 µl de heparina sódica) semanalmente durante el primer mes de intoxicación, y a los seis meses de exposición a plomo.

El método utilizado fue el descrito por Arroyo y cols<sup>139</sup>, utilizando espectrofotometría de absorción atómica con el empleo de un método de atomización de horno de grafito. El equipo instrumental utilizado está compuesto por un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer mod#5000, atomizador de horno de grafito HGA-400, muestrador atómico AS-40 y una estación de datos 3600.

#### **1.4. Determinación de la actividad de renina plasmática.**

Se utilizó un kit comercial de radioinmunoensayo (Renctk, DiaSorin, Saliggia, Italia) que determina la actividad de renina plasmática mediante un test cuantitativo de angiotensina I en muestras de plasma. Brevemente, se recogieron muestras de sangre total en EDTA y se procesaron de modo similar al anteriormente descrito manteniéndolas durante todo el proceso a 4°C. Posteriormente se incubaron a 37°C, 90 minutos, pH 6.0, en presencia de fenilmetilsulfonil fluoretano (PMSF) y de Ileu-5-angiotensina I marcada con <sup>125</sup>I, procedimiento tras el cual se paró la reacción en frío. Las muestras fueron distribuidas en tubos recubiertos de un anti-suero de conejo, y tras un periodo de incubación (3h a temperatura ambiente), se midió la reactividad de los mismos. Se utilizó un marcador así como un patrón de Ileu-angiotensina I con concentraciones 0-50 ng/mL para calcular la actividad de renina plasmática en las muestras. Este método presenta una sensibilidad del 95% con un coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo < 7% y < 11% respectivamente.



## 2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.

Se utilizó el método descrito por Mulvany y Halpern <sup>140</sup>. Brevemente, se procedió a seccionar la aorta torácica en segmentos de 2 mm de longitud que fueron inmediatamente introducidos en solución de Krebs (en mmol/l: NaCl 115, KCl 4.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glucosa 11.1 y EDTA 0.02, pH 7.4), en un baño de órganos. Dentro del mismo, se introdujeron dos alambres de tungsteno de 40 µm de diámetro dentro de la luz del vaso, estando uno de ellos conectado a un transductor de fuerza el cual, a su vez, está acoplado a un sistema informático ( Power Lab 400, AD Instruments; Casterhill, NSW, Australia), que registra los cambios de tensión dentro del vaso. Se permitió que los segmentos arteriales se equilibrasen durante una hora, a un tensión óptima preestablecida de 2 g. Tras este periodo, se probó la contractilidad de los segmentos con KCl 20 mmol/l, tras lo cual se determinó la capacidad de relajación frente a dosis crecientes de acetilcolina (Ach) ( $10^{-11}$  a  $10^{-5}$  mol/l) en los segmentos precontraídos con fenilefrina ( $10^{-5}$  mol/l). A continuación se repitió el mismo proceso utilizando nitroprusiato sódico (NPS), un dador exógeno de NO, con el objeto de testar la capacidad de relajación no dependiente del endotelio. Las concentraciones de NPS utilizadas fueron  $10^{-11}$  a  $10^{-5}$  mol/l. Las curvas dosis-respuesta para ambos agentes vasodilatadores se calcularon de forma acumulativa.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de indometacina ( $10^{-5}$  mol/l) para bloquear cualquier efecto mediado por la activación de ciclooxigenasas.

### **3. ESTUDIO DE LA SINTASA ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO.**

#### **3.1. Expresión proteica de la eNOS.**

La expresión proteica de eNOS, al igual que la de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs y de las caveolinas, se analizó mediante Western blot según el procedimiento descrito previamente<sup>100</sup>.

Brevemente; las muestras fueron sometidas a lisis mecánica seguida de una lisis térmica, y finalmente disueltas en tampón de Laemmli con 2-mercaptoetanol<sup>141</sup>. Las proteínas obtenidas por este método fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 10%. Se cargaron idénticas cantidades de proteína ( 20  $\mu$ g por pocillo) estimadas por el método del ácido bicinónico (Pierce Rockforc, IL, USA). Para comprobar la homogeneidad de la cantidad de proteína cargada en cada pocillo, el gel se tiñó con Coomassie verificando la intensidad de las bandas proteicas.

Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Immobilion-P, Millipore). Para bloquear la membrana se incubó toda la noche a 4°C con 5% de leche desnatada en TBS-T (20 mmol/l de Tris-HCl, 137 mmol/l NaCl, 0.1% Tween 20). El análisis de Western Blot se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal comercial (Transduction Laboratories). Se incubó con el primer anticuerpo (1:2500) durante una hora a temperatura ambiente, y tras lavados exhaustivos, se incubó con el segundo anticuerpo (anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa) en una dilución 1:1500 durante 1h. Finalmente se detectó la proteína eNOS mediante quimioluminiscencia con un kit comercial (ECL, Amersham Corp) y se realizó una estimación cuantitativa mediante densitometría (Molecular Dynamics). Se utilizó un marcador de peso molecular

de peso molecular preteñido (Sigma) para determinar el peso molecular de la banda obtenida. Como previamente se ha descrito<sup>142</sup>, los anticuerpos monoclonales reconocen específicamente la isoforma de la eNOS de 140 kDa y no presentan reactividad cruzada con la isoforma inducible, dado que la banda de proteína eNOS no fue detectable en un homogeneizado de macrófagos de ratón tratados con lipopolisacárido, y si hubo reactividad con controles positivos obtenidos de homogeneizados de células endoteliales bovinas y humanas.

Además, para comparar la expresión de eNOS con la otra proteína constitutiva, analizamos la expresión de  $\beta$ -actina mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -actina (Sigma Aldrich). Con esta finalidad, se corrió un gel paralelo con las mismas muestras y, tras realizar la transferencia a membranas de nitrocelulosa, se realizó el análisis Western blot con el anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -actina (1:2000).

#### **3.4. Determinación de caveolinas.**

Se utilizó el mismo método que para la determinación de la expresión proteica de eNOS. El anticuerpo utilizado para el análisis Western blot fue anti- $\alpha$  caveolina 1 (primer anticuerpo), a una dilución 1:500, durante 1 hora a temperatura ambiente y tras lavados exhaustivos, se incubó con el segundo anticuerpo (anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa) en una dilución 1:1500 durante 1h. La detección de las bandas proteicas y su estimación cuantitativa se realizaron según los métodos especificados para la determinación proteica de la eNOS.



## **4. ESTUDIO DE LA GCS VASCULAR.**

### **4.1. Actividad de la GCs vascular.**

Se estudió la actividad de la guanilato ciclasa soluble vascular en aorta de ratas intoxicadas y en sus respectivos controles, mediante la determinación del GMPc basal y el GMPc resultante de la estimulación con dosis crecientes de nitroprusiato sódico, un dador exógeno de NO y por tanto un estimulador de la actividad de la guanilato ciclasa soluble independiente de la actividad del endotelio.

Las aortas se extrajeron según el método anteriormente expuesto y se seccionaron en 5 segmentos de 4 mm de longitud aproximadamente que se introdujeron de forma aislada en medio de cultivo (RPMI, 5% FCS, 37°C) conteniendo el inhibidor de la fosfodiesterasa 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 2 mmol/L). Se añadió NPS para alcanzar concentraciones de 0,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  mol/l. Tras un periodo de incubación de 2 min a 37°C, se paró la reacción congelando las muestras en nitrógeno líquido.

Se efectuó una lisis mecánica del tejido, tras la cual se resuspendieron las muestras en una solución con ácido tricloro acético, 200 mmol/l, 4°C. Se procedió a centrifugar las muestras (12 000 rpm, 15 min, 4°C), tras lo cual se separaron los sobrenadantes y se lavaron cinco veces con cinco volúmenes de dietil éter. La fase acuosa resultante se secó bajo un flujo de N<sub>2</sub>.

Se determinó la concentración total de proteínas / muestra en el pellet resultante de la lisis según el método descrito por Bradford.

El GMPc de cada muestra se determinó según el método descrito previamente<sup>143</sup> en muestras acetiladas utilizando un kit de Amersham International. La sensibilidad del

ensayo fue de 0.5 fmol y las variaciones intra e inter-ensayo fueron <8.9% y <16%, respectivamente. El resultado se expresó como pmol/mg de proteína de cada muestra.

#### **4.2. Expresión proteica de la GCs vascular.**

El método utilizado fue el mismo que para la determinación de la expresión proteica de eNOS y Caveolinas (Western Blot). Se realizó una incubación con el primer anticuerpo (1:2500) durante 1 hora a temperatura ambiente, y con el segundo anticuerpo (anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa) (1:1500) durante otra hora. Para evaluar la especificidad del anticuerpo frente a la subunidad  $\beta_1$  de la GCs, se utilizó un lisado de plaquetas como control positivo. Además, y al igual que se describe para la determinación proteica de la eNOS, se comparó la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs con la de la  $\beta$ -actina.

#### **4.3. Determinación del ARNm de la GCs vascular.**

Las muestras de aorta, obtenidas como anteriormente se ha explicado y congeladas, fueron procesadas para extracción de ARN. Brevemente, el homogeneizado fue resuspendido y vortado en 800  $\mu$ l de tampón de lisis (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 0.75 M, serosyl 10% y 2 beta-mercaptoetanol). Tras incubar durante 30 minutos a 4°C, la muestra se extrajo tras realizar dos lavados con un volumen equivalente de fenolcloroformo- isoamilalcohol (24:1, v/v). El ARN se resuspendió en H<sub>2</sub>O DEPC y se guardó a -80°C hasta ser utilizado.

Las muestras de ARN se precipitaron y resuspendieron en (mmol/l) Tris 10, NaCl 10, EDTA (pH 8.0), y se incubaron con 3U de ADNasa libre de ARNasas por cada 35  $\mu$ g de ARN total, durante 30 minutos a 37°C para digerir los restos de ADN genómico. El ARN

total (50 a 500 ng) se combinó con 50 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina (AMV) (Promega), en (mmol/l) MgCl<sub>2</sub> 5, KCl 50, Tris-HCl 10, trifosfatos de desoxirribonucleótidos 1, 10 U de inhibidor de ARNasas y 2.5 μmol/L de hexámeros randomizados que sirven de sustrato para la formación de ADNc, utilizando un volumen de reacción de 20 μL durante 15 minutos a 42 °C. Se procedió entonces a calentar las muestras durante 5 minutos a 99 °C para inhibir la actividad de la transcriptasa inversa antes de la PCR

Se utilizaron oligonucleótidos comerciales complementarios al ADN de las subunidades α<sub>1</sub> y β<sub>1</sub> de la GCs (GIBCO BRL, Life Technologies). Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: subunidad α<sub>1</sub> (sentido 1071, 5'- GAA ATC TTC AAG GGT TAT G-3' y reversa, antisentido 1896, 5'-CAC AAA GCC AGG ACA GTC-3'), subunidad β<sub>1</sub> (sentido 1450, 5'- GGT TTG CCA GAA CCT TGT ATC CAC C-3' y reversa, antisentido 1733, 5'-GAG TTT TCT GGG GAC ATG AGA CAC C-3') y β-actina (sentido 35, 5'-GAT CAT GTT TGA GAC CTT CAA CAC C-3' y reversa, antisentido 1017, 5'-AGT TTC ATG GAT GCC ACA GCA TTC C-3').

El ADNc se amplificó (25 a 31 ciclos) a 92°C durante 1 minuto, 58°C durante 1.5 minutos y 72°C durante 3 minutos (temperaturas de fusión, alineamiento y extensión, respectivamente). Para la PCR, los primers se utilizaron en concentraciones de 1 μmol/L para las subunidades α<sub>1</sub>- y β<sub>1</sub>-, y 0.2 μmol/L para la β-actina. Se utilizó una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2 mmol/l, y 2.5 U de polimerasa por reacción (Biotools). Tras la amplificación, se realizó una electroforesis de 10 μl del producto de la PCR, en geles de agarosa al 0.9%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de luz

UV y posteriormente, fotografiados. Se utilizó un marcador de peso molecular (100 a 2600 pares de bases, con intervalos de 100 pb) (BioRad), para confirmar el tamaño del resultado de la PCR.

## **5. MÉTODO ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Cada estudio se realizó en un mínimo de seis animales y sus respectivos controles. Las comparaciones se realizaron utilizando la t de Student para muestras pareadas y no pareadas y ANOVA, dependiendo del tipo de experimento. Se utilizó la corrección de Bonferroni para medidas múltiples, para determinar el grado de significación de la p.  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

## ***IV. RESULTADOS***

## 1. ESTUDIOS EN EL ANIMAL INTOXICADO.

### 1.1. Presión arterial y peso corporal.

En la primera parte del estudio se midió la presión arterial media (MAP) basal y en los meses 1º, 3º, 4º, 6º, 9º, 12º mes de intoxicación, con el objetivo de identificar el momento en el que aparecía un aumento significativo de la MAP. Los animales fueron pesados mensualmente sin que halláramos diferencias significativas de peso entre el grupo intoxicado y el grupo control: (en gr) basal  $384.1 \pm 53$  vs  $364.0 \pm 37.0$ , 1er mes  $387.6 \pm 37$  vs  $402.4 \pm 37.4$ , 3er mes  $474.8 \pm 33$  vs  $473.3 \pm 40.3$  y 6º mes  $504.1 \pm 7.4$  vs  $484.3 \pm 35.3$  (Pb vs Control, p ns para todos los periodos)

Los resultados obtenidos para la MAP fueron los siguientes (tabla 7):

**Tabla 7: Presión arterial media**

MAP(mmHg	basal	1er. mes	3er. mes	4º mes	6º mes	9º mes	12º mes
)							
PLOMO	$113.6 \pm 3.1$	$136.6 \pm 4.8$	$141.8 \pm 3.9$	$145.4 \pm 4$	$151.2 \pm 2.2$	$154.3 \pm 1.3$	$158.1 \pm 2.1$
		*	*	**	***	***	***
CONTROL	$118.1 \pm 2.1$	$120.8 \pm 5.8$	$126.0 \pm 5.3$	$132.1 \pm 2.6$	$133.7 \pm 1.2$	$134.0 \pm 1.4$	$135.1 \pm 2.0$

*Tabla 7: MAP durante el proceso de intoxicación. Los asteriscos (\*) indican la variación inter-grupo durante cada periodo del estudio: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .*

Constatamos pues, una aumento significativo de la MAP en el grupo intoxicado ya desde el primer mes de exposición cuando realizamos el análisis inter-grupo.

El análisis de la modificación de la MAP intra-grupo se refleja en la figura 1. Como se puede observar, el punto de máximo ascenso de la MAP en el grupo de ratas

intoxicadas con plomo ocurrió durante el primer mes de exposición, continuando en meses sucesivos la tendencia al alza, aunque con una pendiente menor. El aumento de la MAP observado en el grupo control puede ser atribuido al crecimiento del animal. Dada la duración del estudio, los animales se incluyeron en el mismo a la edad de dos meses cuando aún tienen un crecimiento importante. A partir del cuarto mes de estudio, -6º mes de vida de las ratas-, la MAP se estabilizó como era previsible en el grupo control, al alcanzar los animales la madurez.

En el grupo de ratas intoxicadas esta estabilización no se produjo, continuando el ascenso hasta el final del periodo de estudio.

**Figura 2: Evolución de la MAP a lo largo del periodo de estudio.**

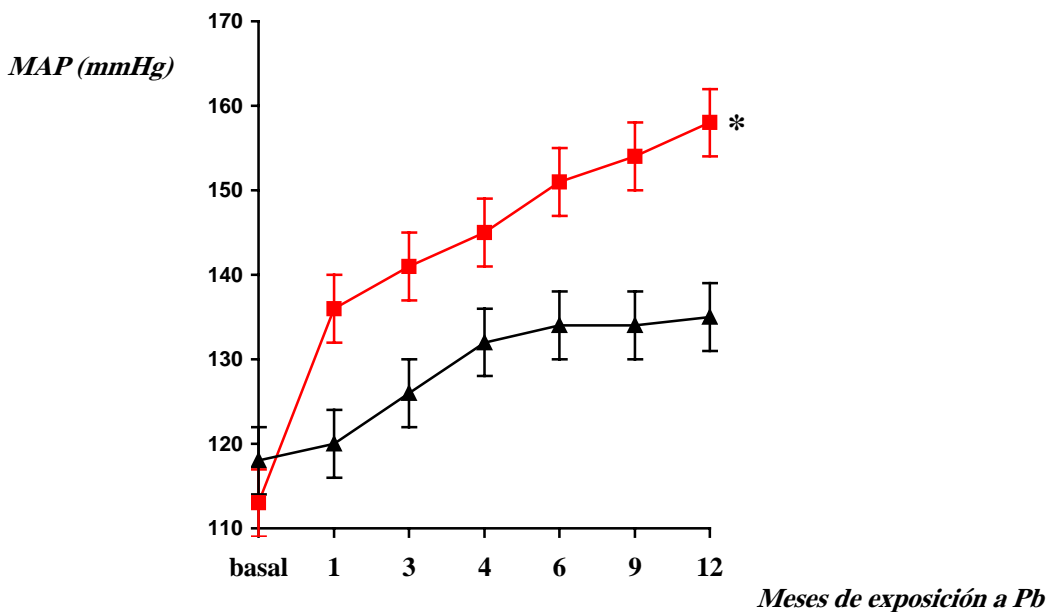


Figura 2: Variación de la tensión arterial media (MAP) en el grupo expuesto a plomo (■) y en el grupo control (▲) durante el periodo de estudio. \* $p < 0.05$ .



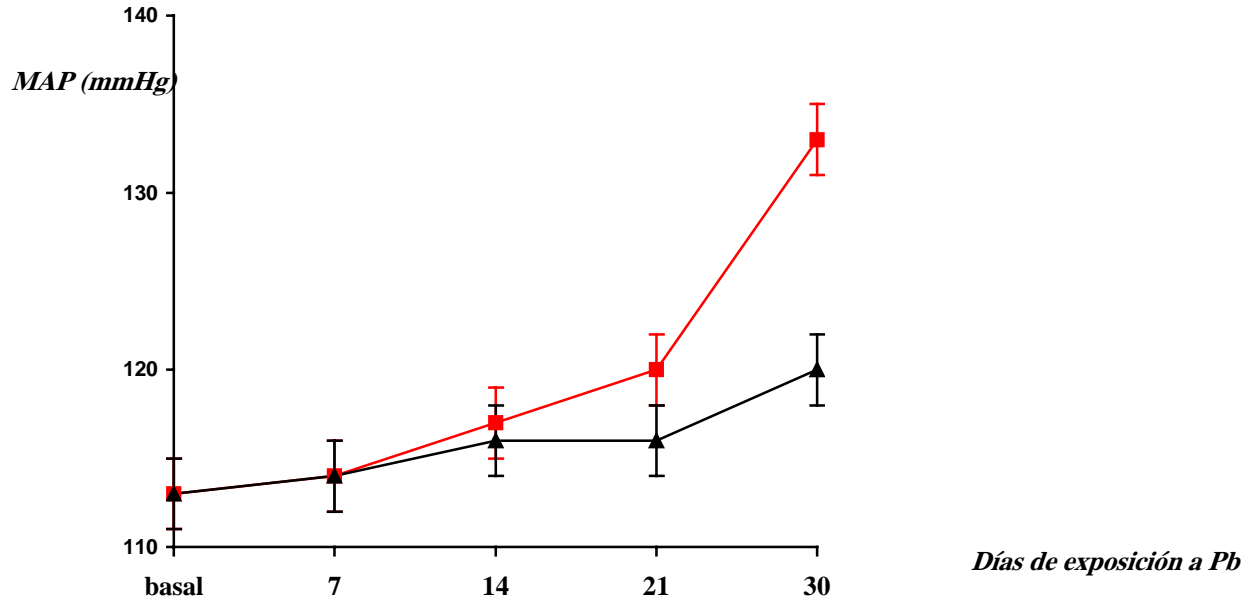
En vista de los resultados anteriores, decidimos estudiar de forma pormenorizada la evolución de la presión arterial durante el primer mes de exposición al plomo. Los resultados se muestran en la tabla 8 y figura 3.

**Tabla 8 : Evolución de la presión arterial durante el primer mes de exposición al plomo.**

MAP(mmHg) basal	7 días	14 días	21 días	30 días
PLOMO	113.6 ± 3.1	114.2 ± 6.3	117.0 ± 1.5	120.8 ± 5.1
				133.6 ± 6.0
				*
CONTROL	118.1 ± 2.1	118.8 ± 3.7	116.3 ± 3.0	116.3 ± 1.5
				120.8 ± 2.1

*Tabla 8: Variación de la presión arterial media (MAP) durante el primer mes de intoxicación. Empezamos a observar diferencias a partir de la 3ª semana de exposición, aunque no alcanzan significación estadística hasta los 30 días ( $p < 0.05$ ).*

**Figura 3: Evolución de la MAP durante el primer mes de intoxicación**



*Figura 3: variación de la presión arterial media (MAP) en el grupo expuesto a plomo (■) y en el grupo control (▲) durante el primer mes de intoxicación. (\* $p < 0.05$ ).*

Las medidas de MAP no mostraron diferencias entre los dos grupos durante las dos primeras semanas. A los 21 días observamos ya un ascenso de la MAP en el grupo intoxicado con Pb, pero sólo a la cuarta semana esta diferencia mostró significación estadística, probablemente por la dispersión de las medidas en el periodo anterior.

## **1.2. Parámetros renales.**

### **1.2.1. Creatinina sérica y aclaramiento de creatinina.**

No encontramos variación significativa de las cifras de creatinina sérica (Cr<sub>s</sub>) en el grupo de ratas expuestas al plomo y tampoco hubo diferencias con el grupo control. Mostramos los valores en la tabla 9.

**Tabla 9: Creatinina sérica a lo largo del periodo de estudio**

Cr sérica (mg/dl)	basal	1er mes	3er mes	6° mes	9° mes	1 año
PLOMO	0.44 ± 0.08	0.49 ± 0.12	0.46 ± 0.06	0.46 ± 0.07	0.48 ± 0.09	0.49 ± 0.07
CONTROL	0.44 ± 0.12	0.50 ± 0.16	0.57 ± 0.12	0.55 ± 0.15	0.54 ± 0.09	0.55 ± 0.07

*Tabla 9: Evolución de las cifras de creatinina sérica a lo largo del periodo de estudio en los animales intoxicados y en el grupo control. No se observaron diferencias significativas intra- ni inter-grupo.*

Tampoco encontramos ningún efecto del plomo sobre el aclaramiento de creatinina (ClCr). Una vez corregido este por el peso corporal (ClCrcor), la ausencia de modificaciones intra grupo se mantuvo (Tabla 10). En la comparación con el grupo control la tendencia fue a encontrar aclaramientos de creatinina más elevados en los animales intoxicados. Pero la dispersión de las medidas hizo que dicha observación careciera de peso estadístico. (Tabla 10).

**Tabla 10: Evolución del aclaramiento de creatinina a lo largo del periodo de estudio.**

CICr (ml/min)	basal	1er mes	3er mes	6º mes	9º mes	1 año
<i>CICrcor</i> (ml/min/kg)						
PLOMO	2.5 ± 0.8	2.7 ± 1.1	2.8 ± 0.9	3.0 ± 0.9	2.9 ± 0.8	2.9 ± 0.6
	6.64 ± 1.2	6.97 ± 1.9	5.9 ± 1.9	5.95 ± 1.0	5.75 ± 1.5	5.75 ± 0.9
CONTROL	2.35 ± 0.75	2.17 ± 0.4	2.0 ± 0.9	2.5 ± 0.6	2.5 ± 0.7	2.8 ± 0.6
	6.45 ± 2.0	5.4 ± 1.1	4.3 ± 1.9	5.16 ± 1.0	5.17 ± 1.9	5.6 ± 0.9

*Tabla 10: Evolución del aclaramiento de creatinina (CICr) a lo largo del estudio. No se observaron diferencias significativas entre casos y controles. Tampoco al corregir el aclaramiento por el peso (CICrcor) aparecieron diferencias significativas.*

### 1.2.2. Proteinuria y microalbuminuria.

A pesar de la ausencia de cambios en los parámetros relacionados con el filtrado glomerular, decidimos estudiar la presencia de marcadores de daño glomerular, dado que la elevación de la tensión arterial aparecía en un periodo muy temprano de la intoxicación y se mantenía hasta el final del periodo de estudio en los animales expuestos a plomo.

La concentración de proteínas en orina recogida durante 24h no se modificó a lo largo de la intoxicación en el grupo expuesto y tampoco encontramos variaciones significativas con el grupo control (Tabla 11).

Decidimos estudiar la eliminación urinaria de albúmina durante los tres primeros meses de intoxicación, por ser un marcador precoz de alteración glomerular además de un indicador de situaciones de hiperfiltración. La determinación de microalbuminuria tiene además la ventaja de obviar la eliminación proteica procedente del túbulo. Pero tampoco en este caso encontramos diferencias significativas entre el grupo intoxicado y el grupo control (Tabla 12).

**Tabla 11: Proteinuria a lo largo del estudio.**

Proteinuria (mg)	24h basal	1er mes	3er mes	6° mes	9° mes	1 año
PLOMO	0.60 ± 0.3	0.6 ± 0.16	0.46 ± 0.19	0.71 ± 0.15	0.6 ± 0.18	0.59 ± 0.16
CONTROL	0.53 ± 0.3	0.71 ± 0.15	0.56 ± 0.2	0.78 ± 0.3	0.59 ± 0.18	0.79 ± 0.27

*Tabla 11. Proteinuria a lo largo del estudio. No encontramos diferencias entre ambos grupos*

**Tabla 12: Microalbuminuria.**

Microalbuminuria 24h (mg)	basal	1er mes	3er mes
PLOMO	0.03 ± 0.006	0.02 ± 0.006	0.03 ± 0.02
CONTROL	0.036 ± 0.13	0.03 ± 0.012	0.04 ± 0.02

*Tabla 12: Microalbuminuria en los tres primeros meses de intoxicación. Tampoco encontramos diferencias entre ambos grupos.*

Los cocientes proteínas/creatinina en orina y albúmina/creatinina no modificaron los resultados anteriores, demostrando la ausencia de errores derivados de la recolección de orina.

### **1.2.3. Excreción urinaria de ácido úrico.**

Dado que una de las características de la nefropatía por plomo es la presencia de un déficit en la eliminación renal de ácido úrico, quisimos comprobar si este modelo de

intoxicación era capaz de reproducir esta alteración en animales en los que la función renal, estimada por los parámetros anteriormente citados, era rigurosamente normal. Los niveles de ácido úrico en las ratas son extremadamente bajos (0.5-1 mg/dl) y están en un rango de poca sensibilidad en los autoanalizadores utilizados para estas determinaciones. Por ello, decidimos evaluar la excreción neta de ácido úrico en 24h. Los resultados se muestran en la tabla 13 y en la figura 4.

**Tabla 13: Excreción renal de ácido úrico en los seis primeros meses de intoxicación.**

Excreción urinaria basal	1er mes	3er mes	6º mes
a. úrico (mg/24h)			
PLOMO	2.26 ± 0.5	1.46 ± 0.5	0.83 ± 0.4
		*	*
CONTROL	2.43 ± 0.5	2.23 ± 0.9	1.65 ± 1.0
			**

*Tabla 13: Excreción neta renal de ácido úrico en las ratas intoxicadas y en los controles. Se observa una disminución significativa de la eliminación de ácido úrico en el primer mes de exposición al plomo. Esta disminución se mantuvo en los meses posteriores.  
(\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ )*

**Figura 4: Excreción renal de ácido úrico.**

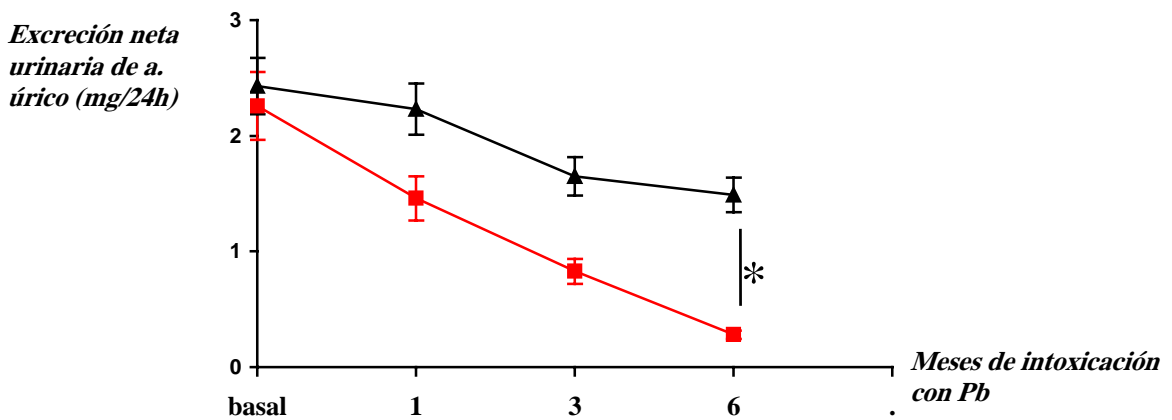


Figura 4: evolución de la eliminación urinaria de ácido úrico a lo largo de la intoxicación. Se observa una disminución de la excreción neta de a. úrico ya desde el primer mes de intoxicación en el grupo expuesto a Pb (■) con respecto al grupo control (▲). Dicha disminución se mantuvo a lo largo del periodo estudiado con la significación estadística arriba reseñada.

Con el objetivo de comprobar la ausencia de errores derivados de la recolección de orina, se calculó la relación a. úrico/creatinina (U/Cr) en orina sin que encontrásemos modificaciones sobre los resultados anteriores.

**Tabla 14: Relación úrico/creatinina en orina.**

U/Cr (orina)	basal	1er mes	3er mes	6° mes
PLOMO	0.19 ± 0.05	0.13 ± 0.01 *	0.06 ± 0.02 *	0.02 ± 0.01 *
CONTROL	0.21 ± 0.04	0.20 ± 0.08	0.12 ± 0.1	0.12 ± 0.08

Tabla148: Relación úrico/creatinina en orina. Los resultados obtenidos son asimilables a los de la excreción neta renal de ácido úrico, lo que demuestra que no existieron errores sustanciales en la recogida de orina. La comparación entre medias tuvo una significación estadística similar: (\*)  $p < 0.05$ .

#### 1.2.4. Manejo renal de sodio.

Las analíticas rutinarias realizadas mostraron una disminución de la excreción fraccional de sodio ya en el primer mes de intoxicación en el grupo de animales expuestos a plomo (tabla 15). El estudio pormenorizado del primer mes de intoxicación demostró que este fenómeno ocurría ya en la primera semana de intoxicación, antes de que pudiéramos encontrar cambio alguno en la tensión arterial o en cualquiera de los parámetros de función renal estudiados (tabla 16). Los niveles de sodio plasmático se mantuvieron dentro de la normalidad y no mostraron diferencias con los del grupo control (tabla 17 y figura 5).

**Tabla 15: Excreción fraccional de sodio a lo largo del periodo de intoxicación.**

EFNa(%)	basal	1er mes	3er mes	6° mes
PLOMO	0.21 ± 0.07	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.04
		*	*	*
CONTROL	0.23 ± 0.08	0.22 ± 0.26	0.22 ± 0.06	0.15 ± 0.07

*Tabla 15: Excreción fraccional de sodio a lo largo del periodo de intoxicación (6 primeros meses). Aparece una disminución del sodio excretado en orina a partir del primer mes de exposición al plomo. Dicha alteración se mantiene en meses sucesivos (\*p<0.05).*

**Tabla 16: Excreción fraccional de sodio durante el primer mes de exposición a plomo.**



EFNa(%)	basal	7 días	14 días	21 días	30 días
PLOMO	0.21 ± 0.08	0.05 ± 0.04 **	0.09 ± 0.03 **	0.13 ± 0.07 *	0.11 ± 0.04 *
CONTROL	0.20 ± 0.07	0.21 ± 0.15	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.09

*Tabla 16: Excreción fraccional de sodio durante el primer mes de intoxicación. Como se puede observar, la alteración encontrada en el manejo renal del sodio se produce ya tras 7 días de exposición a plomo (\*\*p<0.005 y \*p<0.001).*

**Tabla 17 : Niveles de sodio plasmático a lo largo del estudio.**

Na <sub>p</sub> (mEq/l)	basal	1er mes	3er mes	6° mes
PLOMO	137.9 ± 6.3	138.0 ± 1.7	140.7 ± 2.7	144.6 ± 1.5
CONTROL	143.0 ± 6.5	140.2 ± 1.8	142.0 ± 1.8	145.3 ± 2.1

*Tabla17: Cifras de sodio plasmático (Na<sub>p</sub>) a lo largo de la exposición a plomo. Como se puede apreciar, no hubo diferencias intra ni inter-grupo.*

**Figura 5 : Excreción fraccional de sodio**

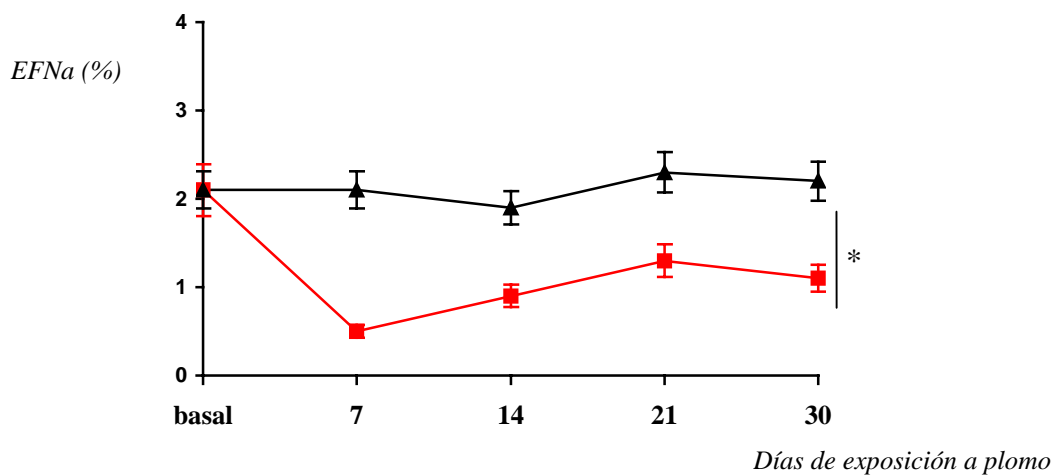
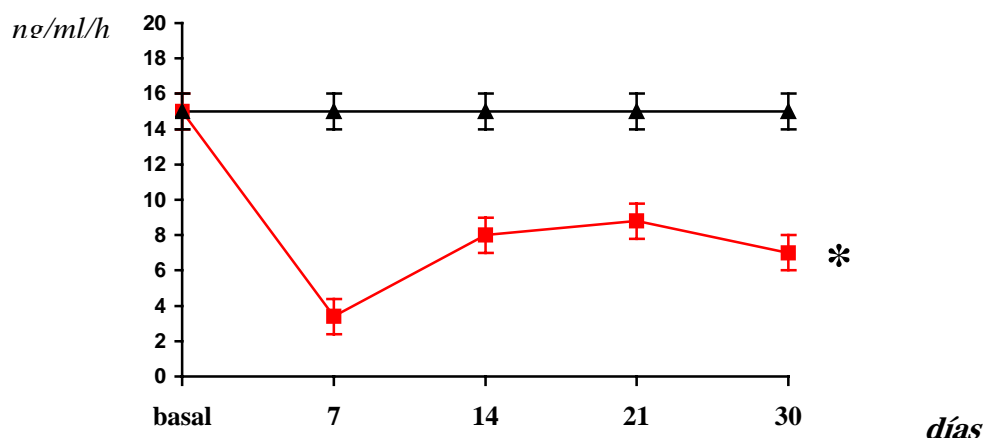


Figura 5: Evolución de la eliminación urinaria de sodio a lo largo del primer mes de intoxicación. Se observa una disminución de la excreción fraccional de sodio ya a los siete días de exposición (■). Dicha disminución se mantuvo durante todo el periodo de estudio con respecto al grupo control (▲) (\* $p < 0.05$ ).

Del mismo modo realizamos una determinación de la actividad de renina plasmática (ARP) para descartar la existencia de un estado de hiperaldosteronismo que justificase las alteraciones en el manejo del sodio. Encontramos una disminución de la ARP ya a los siete días de tratamiento, que se mantuvo a lo largo del periodo de estudio (Figura 6); sin llegar a valores de supresión sugerentes de un estado de hiperaldosteronismo.

**Figura 6: Actividad de la renina plasmática.**



*Figura 6: Evolución de la actividad de renina plasmática a lo largo del primer mes de intoxicación. Se observa una disminución de la actividad de renina plasmática ya a los siete días de exposición (■). Dicha disminución se mantuvo durante todo el periodo de estudio con respecto al grupo control (▲) (\* $p < 0.05$ ).*

Estos resultados apuntan hacia la existencia de un mecanismo presor y estimulador de la resorción de Na distinto del eje renina-angiotensina-aldosterona.

### **1.3. Plumbemia.**

Los valores de plomo en sangre se determinaron a los 30 días y a los seis meses de exposición hallando cifras muy similares en ambos tiempos: ( en  $\mu\text{g/dl}$ ) 30 días  $21.02 \pm 2.1$  vs  $2.01 \pm 0.3$ , 6 meses  $19.01 \pm 3.3$  vs  $1.88 \pm 0.6$  (plomo vs control). Estas cifras eran

asimilables a los niveles encontrados en humanos con exposición ambiental al plomo (ver introducción).

## **2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.**

Una vez identificado el momento en el cual la exposición a plomo provoca alteraciones hemodinámicas con relevancia clínica como aparición de hipertensión arterial y alteraciones en el manejo renal del sodio, decidimos enfocar los estudios centrados en la fisiopatología vascular en ese mismo periodo: el primer mes de intoxicación por plomo.

### **2.1. Relajación dependiente de endotelio.**

Estudiamos de la respuesta vasorelajadora inducida por dosis crecientes de acetilcolina, un estimulador de la actividad de la sintasa endotelial de óxido nítrico, en las aortas procedentes de animales intoxicados durante 7, 14, 21 y 30 días y en sus respectivos controles.

La Ach indujo una relajación dosis-dependiente en los segmentos aórticos de los controles (Figura 6). La relajación obtenida con Ach estuvo significativamente disminuida en los segmentos aórticos de los animales tratados con plomo durante 30 días (Figura 7). La  $EC_{50}$  para los anillos vasculares controles fue de  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, mientras la  $EC_{50}$  para los segmentos aórticos de los animales expuestos a Pb durante 30 días fue de  $0.9 \times 10^{-6}$  mol/l ( $p < 0.05$ ). Además, la respuesta máxima a Ach que se obtuvo en los segmentos aórticos de los controles fue significativamente mayor que la de los anillos procedentes de

las ratas tratadas con plomo. (Figura 7). Los periodos más tempranos de exposición mostraron una alteración de la relajación a Ach que fue progresivamente mayor a medida que evolucionaba la exposición a plomo, sin que alcanzasen significación estadística (Figura 8).

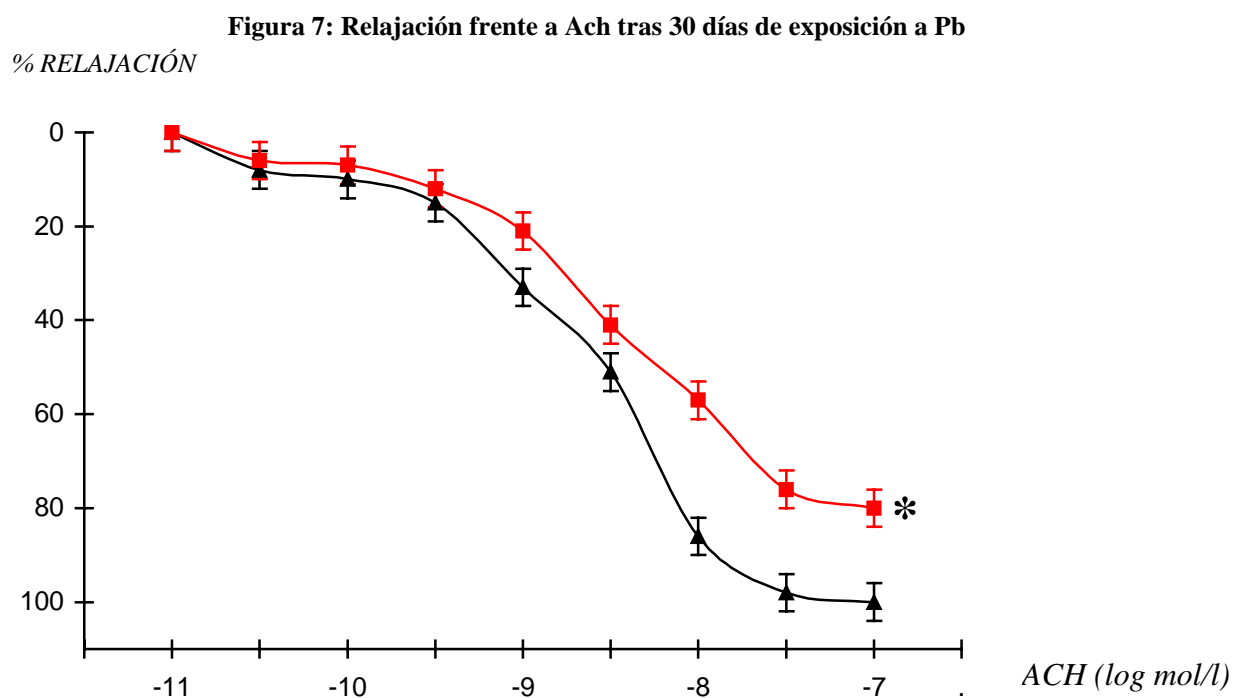
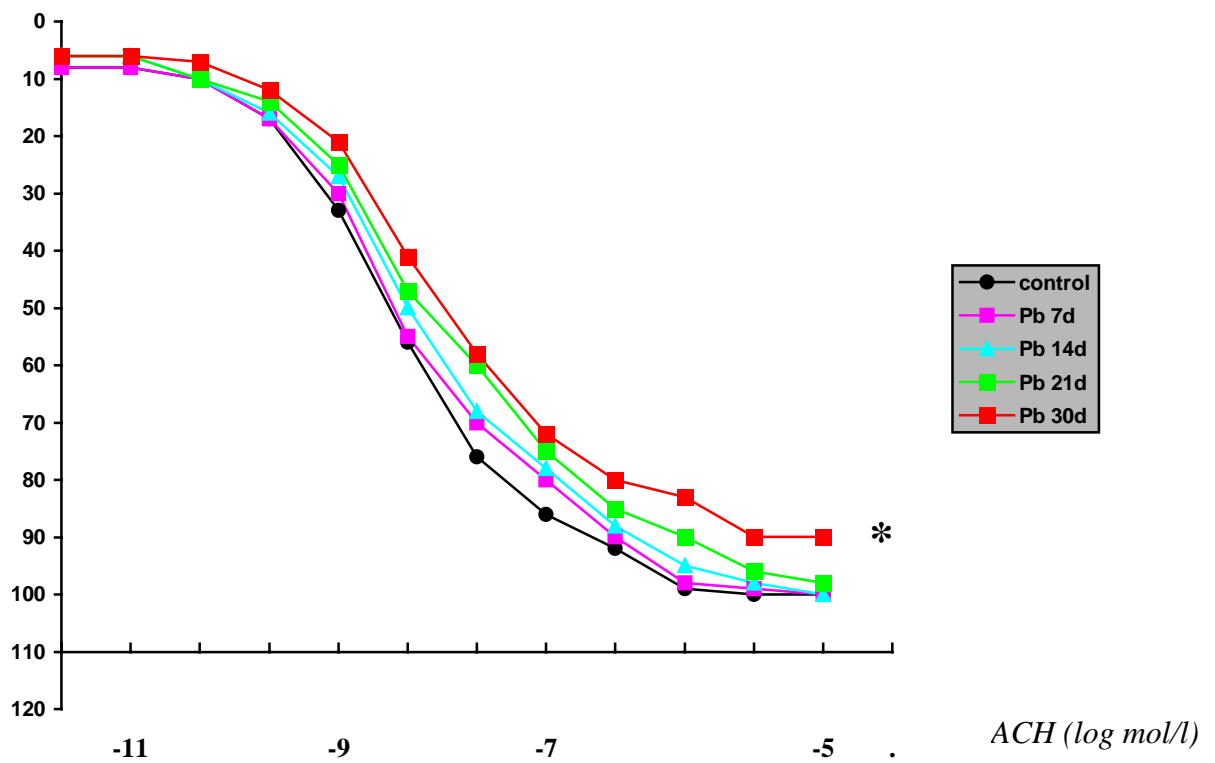


Figura 7: relajación obtenida con Ach en los segmentos aórticos de las ratas tratadas con Pb durante 30 días (▲) y en los controles (■). Se observa una disminución en la capacidad de relajación en las aortas procedentes de los animales expuestos respecto a los controles. (\* $p < 0.05$ )

**Figura 8: Respuesta a acetilcolina a lo largo del periodo de estudio.**

% RELAJACIÓN



*Figura 8: Respuesta vasodilatadora a acetilcolina: se aprecia una disminución progresiva de la capacidad de vasorelajación de las aortas de los animales intoxicados, alcanzando significación estadística sólo en el periodo de 30 días de exposición. (\*p<0.05).*

Esto indica la existencia de una alteración bien en la generación de NO por parte del endotelio, bien en la respuesta del músculo liso vascular al NO generado.

## 2.2. Relajación no dependiente de endotelio.

El Nitroprusiato sódico (NPS), agente vasodilatador por un mecanismo no dependiente de endotelio, indujo una vasorrelajación dosis-dependiente tanto en los segmentos arteriales de las ratas tratadas con plomo como en los controles (Figura 9). La respuesta vasodilatadora obtenida en los anillos aórticos procedentes de las ratas tratadas durante 30 días con plomo estaba significativamente alterada (Figura 10). La  $EC_{50}$  para la relajación inducida por NPS fue mayor en los animales tratados con plomo durante 30 días que en los controles ( $EC_{50}$  plomo:  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, control:  $3 \times 10^{-8}$  mol/L,  $p < 0.05$ ). Además, la máxima relajación obtenida con NPS fue también inferior en los anillos de los animales tratados con plomo durante 30 días (Figura 9).

Al igual que en el caso de la relajación inducida por Ach, periodos inferiores de intoxicación mostraron ya una alteración en la respuesta aunque sin alcanzar significación estadística (Figura 10).

**Figura 9: Respuesta a NPS tras 30 días de exposición a Pb.**

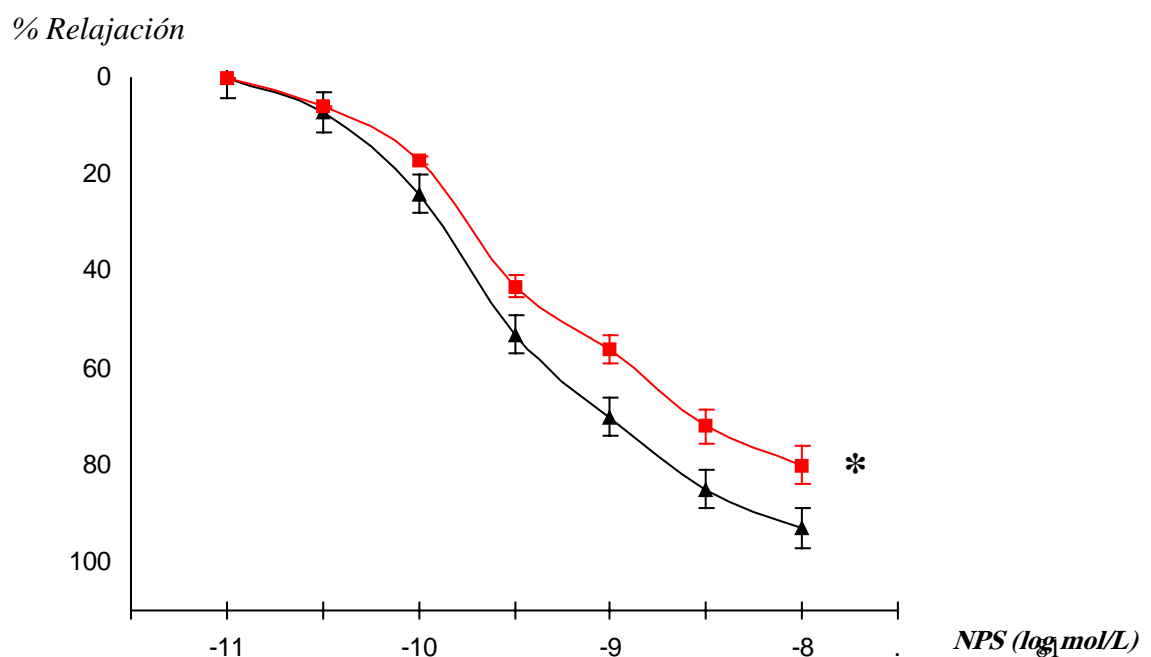
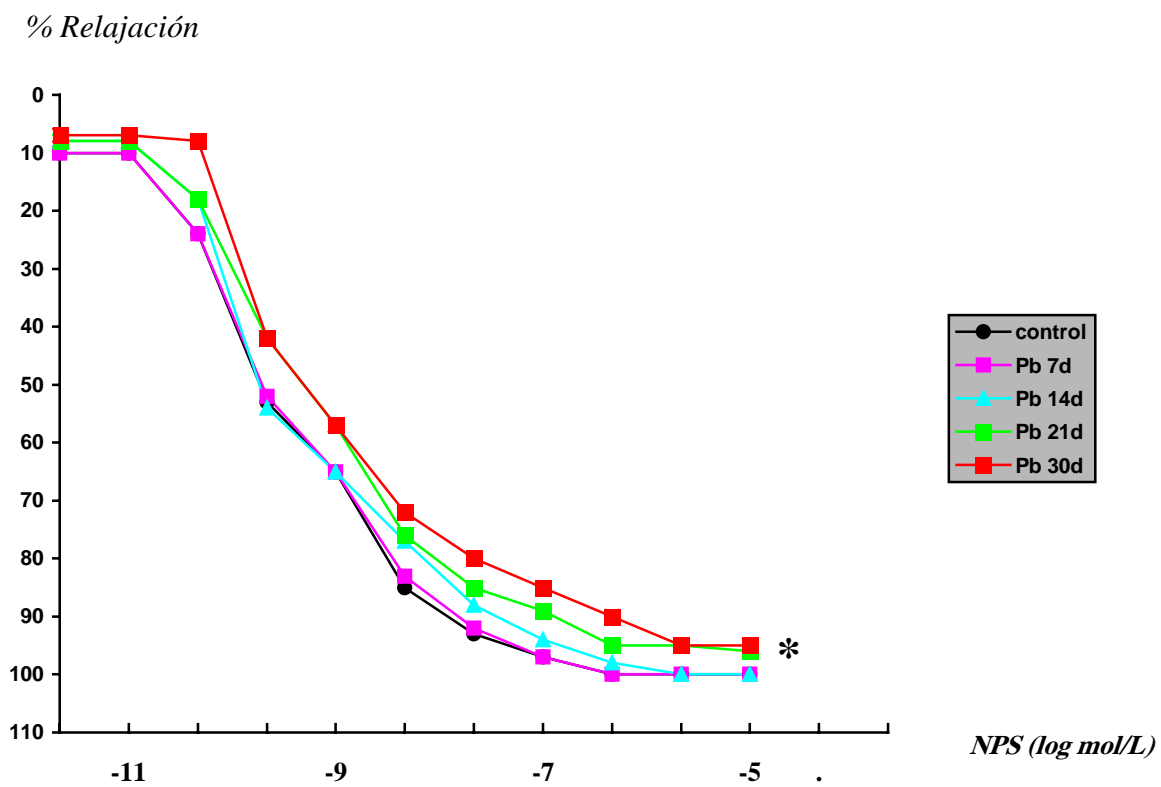


Figura 9: relajación obtenida con NPS en los segmentos aórticos de las ratas tratadas con Pb durante 30 días (■) y en los controles (▲). Se observa una disminución en la capacidad de relajación en las aortas procedentes de los animales expuestos respecto a los controles. (\* $p < 0.05$ )

**Figura 10 : Respuesta a nitroprusiato sódico.**



*Figura 10: Respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico(NPS): se aprecia una disminución progresiva de la capacidad de vasorelajación de las aortas de los animales intoxicados, alcanzando significación estadística en las aortas de los animales expuestos a Pb durante 30 días. (\* $p < 0.05$ ).*

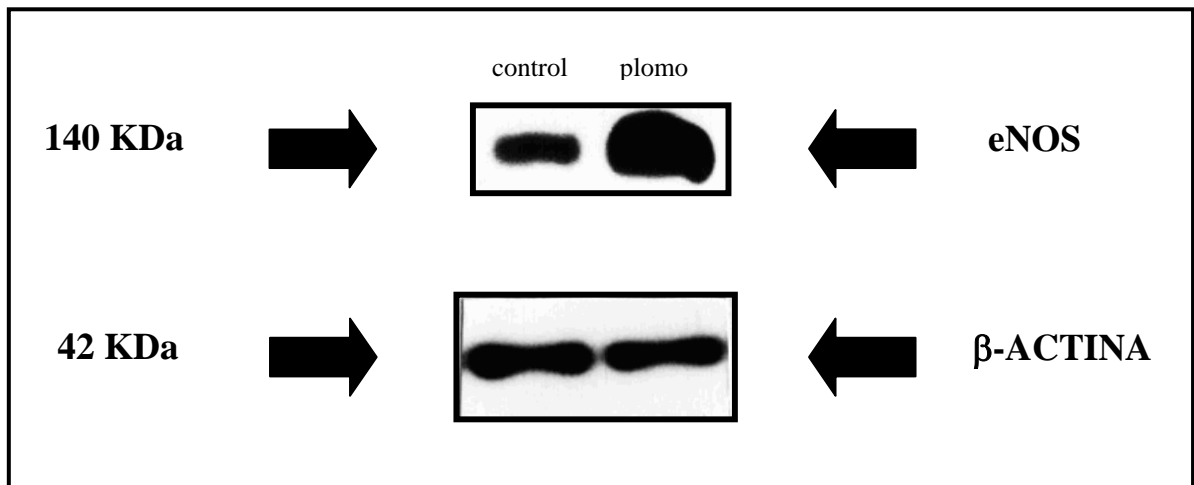


### 3. ESTUDIO DE LA ENOS.

#### 3.1. Expresión proteica de la eNOS.

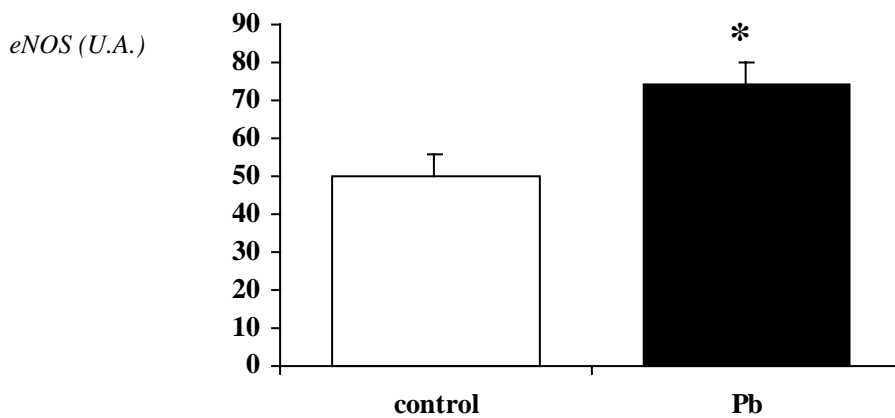
Como se puede observar en las figuras 11A y 11B, los segmentos aórticos obtenidos de los animales tratados con plomo durante 30 días, presentaron un incremento de la expresión de la proteína eNOS. Periodos inferiores de exposición no mostraron diferencias significativas en el análisis Western blot respecto a los controles.

**Figura 11A: Análisis Western blott de la expresión de la proteína eNOS.**



*Figura 11A: Análisis Western blot de la expresión de la proteína eNOS en la pared vascular de los controles y de los animales tratados con plomo. Se observa un aumento de la intensidad de la banda correspondiente a los animales tratados. El análisis de la  $\beta$ -actina no mostró diferencias significativas.*

**Figura 11B: Análisis densitométrico del Western blot eNOS.**



*Figura 11B: Análisis densitométrico del resultado del Western blot para la expresión de eNOS. Se cuantifica un incremento en la banda correspondiente a los animales tratados con plomo respecto a los controles. \* $p < 0.05$ .*

### 3.4. Expresión proteica de caveolinas.

Estas proteínas, integradas dentro de la estructura de la membrana celular, modifican la superficie de la célula produciendo invaginaciones. Las enzimas y/o los receptores de membrana que quedan incluidos dentro de la invaginación pueden perder actividad por disminución de la accesibilidad al sustrato. Este es el caso de la eNOS, por lo que decidimos determinar la expresión proteica de la caveolina-1 (cadena  $\alpha$ ) mediante análisis Western blott. Utilizamos la expresión de  $\beta$ -actina como control interno al igual que en los experimentos anteriores. Los resultados se muestran en la figura 12A y B.

### Figura 12A: Análisis Western blott de la alfa-caveolina-1.

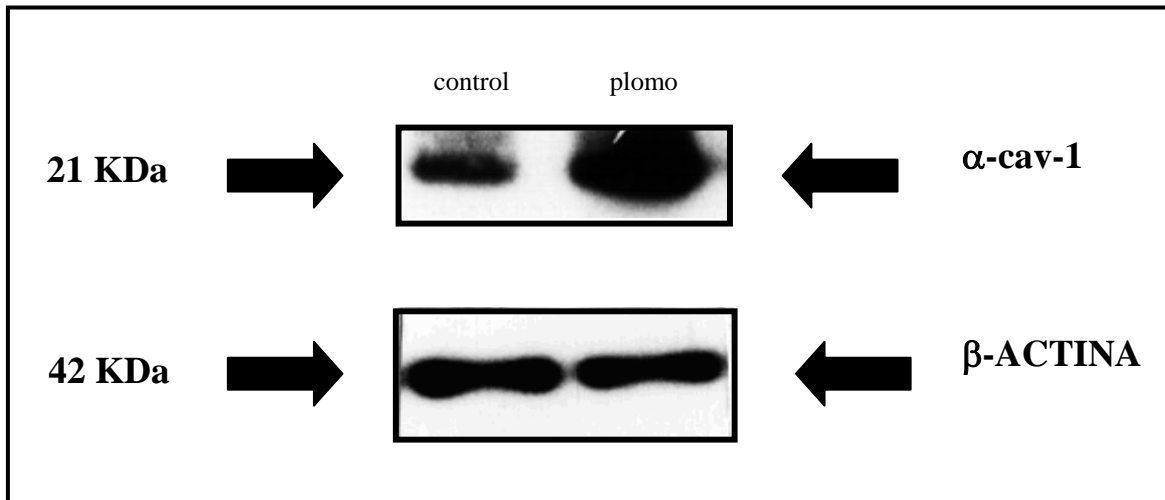


Figura 12A: Análisis Western blot de la expresión de la caveolina 1 en la pared vascular de los controles y de los animales tratados con plomo. Se observa un aumento de la intensidad de la banda correspondiente a los animales tratados. El análisis de la  $\beta$ -actina no mostró diferencias significativas.

Figura 12B: Análisis densitométrico del Western blot.

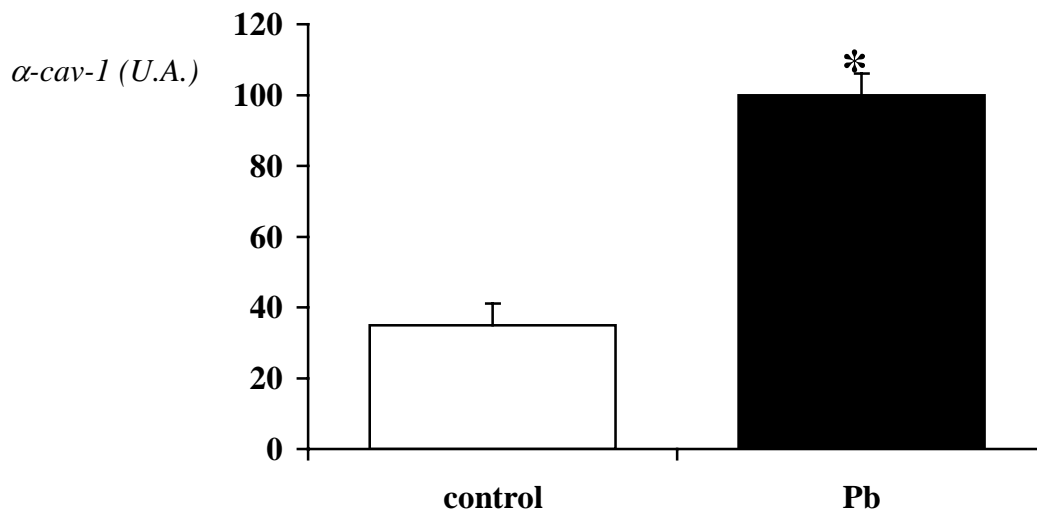


Figura 12B: Análisis densitométrico del resultado del Western blot para la expresión de caveolina1. Se cuantifica un incremento en la banda correspondiente a los animales tratados con plomo respecto a los controles. \* $p < 0.05$ .

#### 4. ESTUDIO DE LA GUANILATO CICLASA SOLUBLE VASCULAR.

##### 4.1. Actividad de la GCs.

Tanto la actividad basal como la estimulada por SNP estuvieron significativamente disminuidas en las aortas de los animales tratados con plomo durante 30 días (Figura 13). La incorporación del dador de NO, NPS, provocó un incremento dosis-dependiente del contenido de GMPc en la pared vascular de los controles (Figura 13). La curva de acumulación de GMPc estuvo significativamente disminuida en los animales tratados durante 30 días con plomo respecto a los controles (Figura 13).

**Figura 13: Actividad basal y estimulada con NPS de la guanilato ciclasa soluble vascular.**

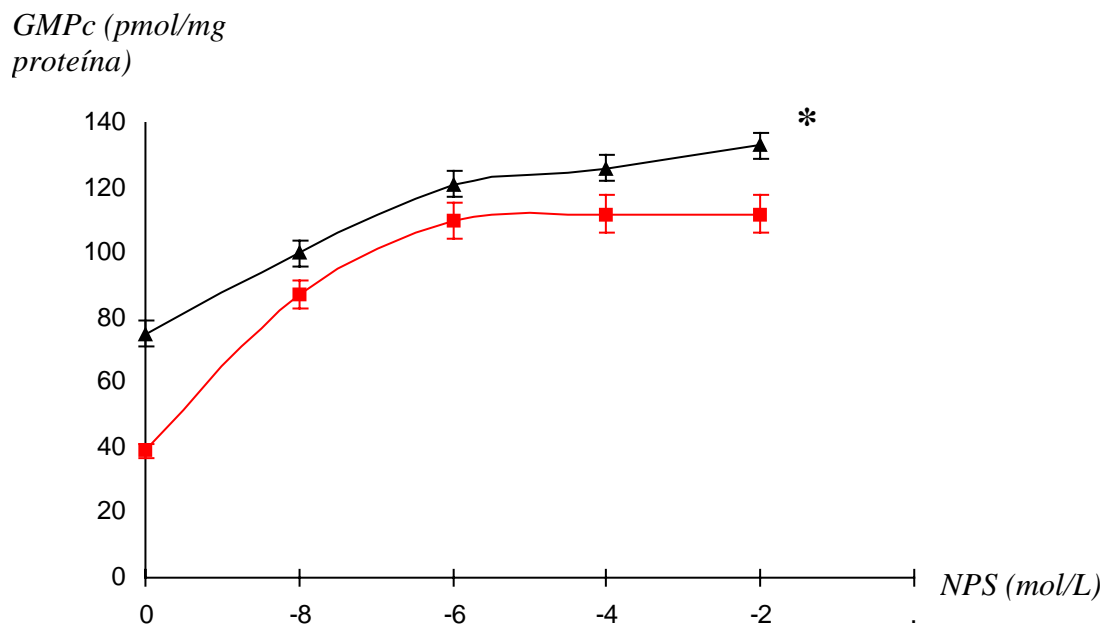
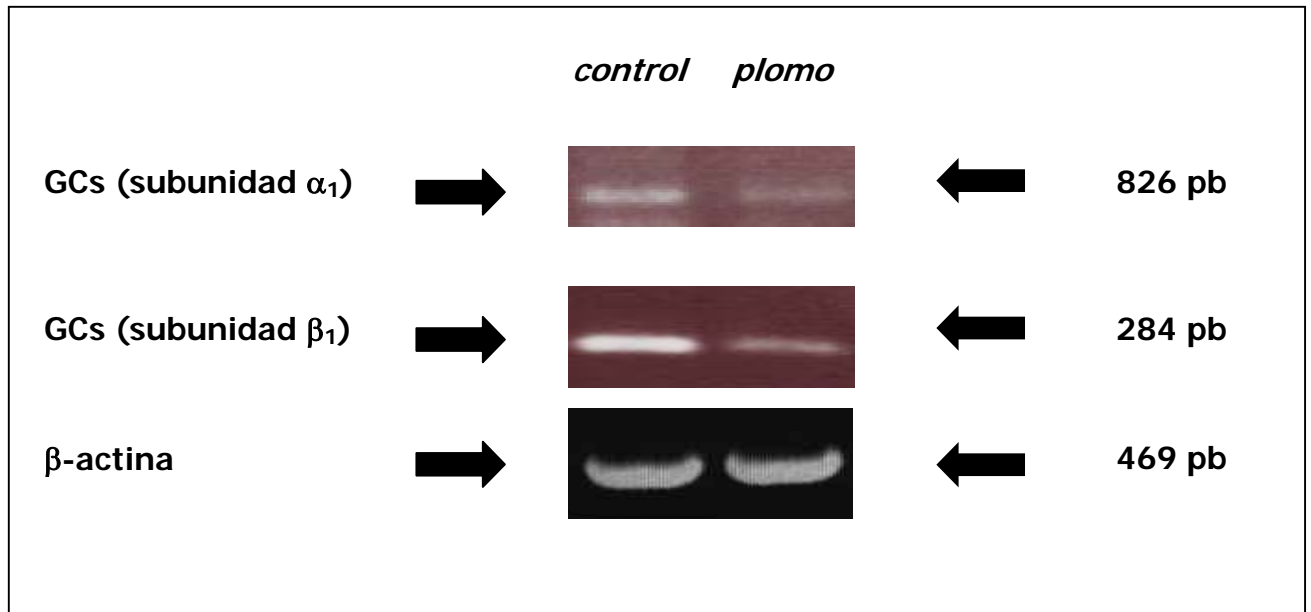


Figura 13: Contenido de GMP cíclico en la pared vascular de controles (▲) y animales expuestos a plomo durante 30 días (■), antes y después de la administración de dosis crecientes del NPS. (\* $p < 0.05$ ).

#### 4.2. Expresión de la guanilato ciclasa soluble en la pared vascular.

La pared vascular de las ratas tratadas con plomo durante 30 días mostró una reducción marcada de ambas subunidades  $\alpha 1$ - y  $\beta 1$ - de la GCs (Figura 14). No encontramos diferencias tras amplificar la  $\beta$ -actina como control interno de la PCR.

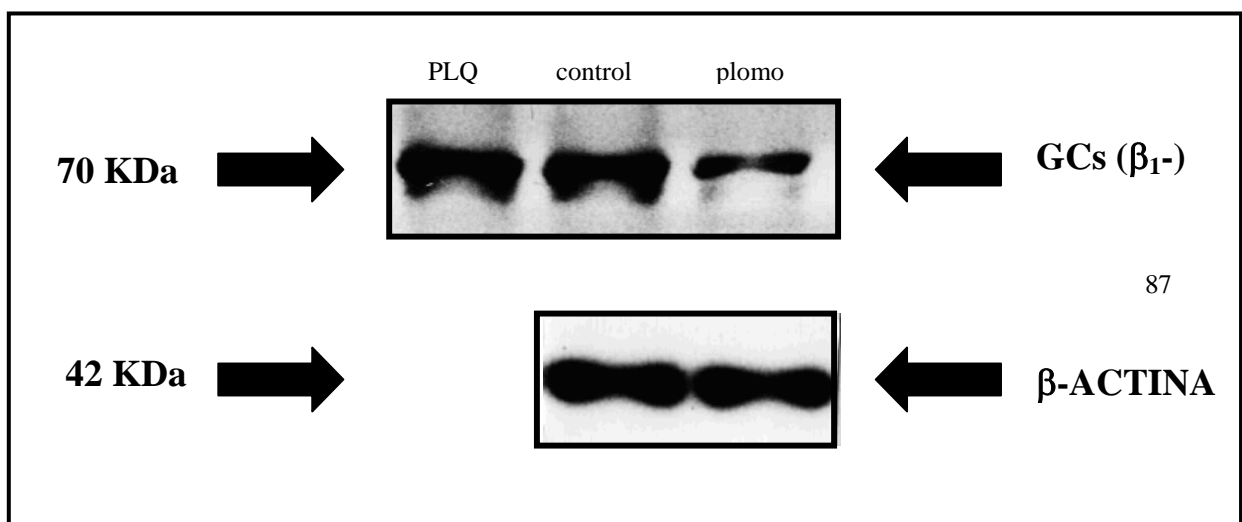
**Figura 14: Análisis de la expresión de la guanilato ciclasa soluble de la pared vascular mediante PCR.**



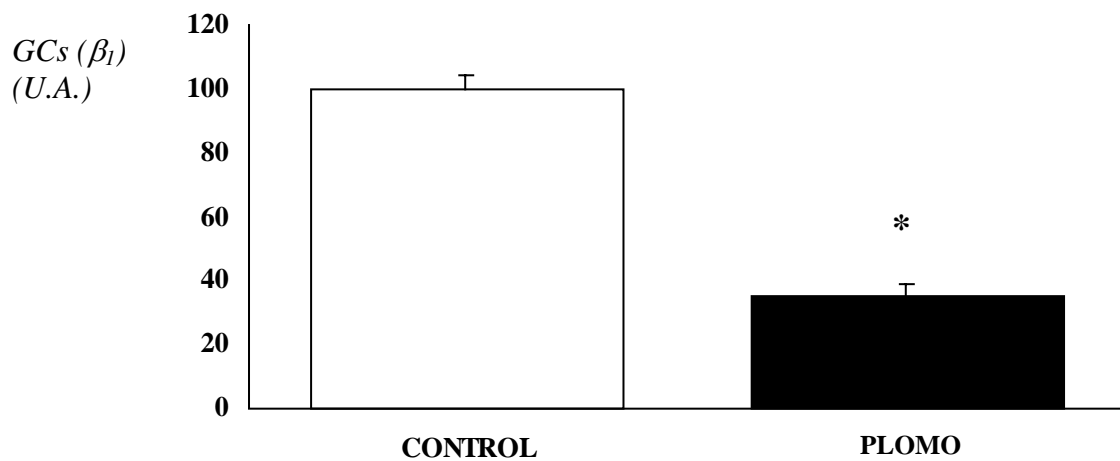
*Figura 14: Análisis RT-PCR mostrando la expresión de las subunidades  $\alpha_1$ - y  $\beta_1$ - de la guanilato ciclasa soluble (GCs) en la pared vascular de los controles y de los animales expuestos a plomo durante 30 días. LA RT-PCR de la  $\beta$ -actina se utilizó como control interno.*

El análisis mediante Western blot de la expresión proteica de la subunidad  $\beta_1$ - de la guanilato ciclasa soluble vascular confirmó los hallazgos de la PCR. La expresión de la subunidad  $\beta_1$ - de la GCs estaba significativamente disminuida en la pared vascular de las ratas expuestas a plomo durante 30 días. (Figuras 15 A y 15 B)

**Figura 15A: Análisis Western blot de la subunidad beta 1 de la GCs vascular.**



**Figura 15B: Análisis densitométrico del Western blot.**



*Figuras 15A y 15B: Análisis Western blot de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de la guanilato ciclasa soluble en la pared vascular controles y de los animales tratados con plomo. Se utilizó un control positivo consistente en un lisado de plaquetas (PLQ). Se observa una disminución de la intensidad de la banda correspondiente a los animales tratados. El análisis densitométrico del resultado del Western blot para la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de la guanilato ciclasa soluble demostró una disminución en la banda correspondiente a los animales tratados con plomo respecto a los controles. \* $p < 0.05$ .*

## ***V. DISCUSIÓN***

## 1. PLOMO Y PRESIÓN ARTERIAL.

La intoxicación con dosis ultra bajas de plomo indujo elevación de la presión arterial acompañada de disminución de la excreción renal de sodio y ácido úrico, en un modelo similar al que aparece en algunos tipos de hipertensión arterial esencial asociadas a hiperuricemia<sup>35</sup>.

El modelo de intoxicación utilizado en este trabajo se caracterizó por provocar un incremento en la presión arterial del animal de experimentación que se inicia en estadios muy precoces de exposición sin que aparezcan alteraciones analíticas sugerentes de daño estructural renal. Este hecho concuerda con los datos que aparecen en la literatura respecto a distintos modelos animales de intoxicación por plomo y que ya hemos expuesto en la introducción. Curiosamente, en los modelos de intoxicación con altas dosis de Pb (5000 ppm) no aparecen cambios en la presión arterial del animal de experimentación pero sí aparecen las alteraciones histológicas típicas a partir de los nueve meses de intoxicación<sup>44</sup>. Sin embargo; los modelos de intoxicación con dosis bajas de plomo (100 ppm) provocan aparición de hipertensión animal a partir del tercer mes de intoxicación<sup>46</sup>.

No existían datos en la literatura respecto a la aparición de HTA utilizando dosis “ultra-bajas” de plomo (5 ppm) aunque este modelo es el que logra unos niveles de plumbemia más próximos a los que aparecen en la exposición ambiental a este metal, y además se ha comprobado que es capaz de inducir los cambios tubulares típicos de la exposición a este metal, como es la aparición de cuerpos intranucleares e inclusiones intracitoplásmicas en el epitelio del túbulo proximal, sin que aparezcan alteraciones estructurales vasculares o intersticiales detectables en la microscopía óptica<sup>43</sup>. Los datos obtenidos en este trabajo



demuestran que este modelo de intoxicación con dosis “ultra bajas” de plomo logra unos niveles de plumbemia en el animal de experimentación similares a los que aparecen en los casos de intoxicación subclínica por plomo en nuestro medio (entorno a 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ )<sup>6</sup>, induce elevación en la presión arterial en el animal de experimentación tras la tercera semana de exposición y dicha elevación se mantiene hasta los doce meses sin alteraciones en los niveles de creatinina sérica, aclaramiento de creatinina y proteinuria. Aunque sería necesario disponer de métodos más precisos para evaluar el filtrado glomerular y la presión de perfusión renal, a la vista de los resultados expuestos creemos que este modelo permite estudiar la evolución de la hipertensión arterial inducida por plomo en sus estadios más incipientes y sin que existan grandes cambios estructurales vasculares y renales que puedan interferir con la fisiopatología vascular.

## **2. PLOMO, MANEJO RENAL DEL SODIO Y ÁCIDO ÚRICO.**

La intoxicación con plomo indujo disminución de la excreción de sodio y ácido úrico en los estadios más precoces de la misma. La ausencia de modificaciones en los parámetros más habituales de función renal (creatinina sérica y aclaramiento de creatinina, microalbuminuria y proteinuria) a lo largo de todo el periodo de estudio, junto con el despistaje de un estado de hiperaldosteronismo hacen pensar que la causa de estos fenómenos estriba en una alteración de la hemodinámica intrarenal, en la que entrarían en funcionamiento los ajustes de la presión glomerular encaminados a mantener el filtrado glomerular.

Es conocido que la hiperuricemia es un factor de riesgo cardiovascular independiente<sup>34,35</sup>. La explicación de este hecho estriba en dos vertientes. Por un lado la síntesis de ácido úrico a partir de la xantina produce radicales superóxido en condiciones de hipoxia tisular<sup>144</sup>. Los radicales superóxido actúan secuestrando el NO circulante, favoreciendo por tanto un aumento del tono vascular<sup>35</sup>. De hecho, la inhibición de la xantina oxidasa se acompaña de un marcado descenso del tono microvascular y de la presión arterial en la rata espontáneamente hipertensa<sup>145</sup>. Por otro lado, en los pacientes con hipertensión arterial esencial y resistencia selectiva a la insulina, se produce una disminución de la excreción urinaria de ácido úrico que parece estar vinculada a un aumento de la reabsorción tubular de sodio. El origen de esta alteración no está del todo esclarecido, pero parece relacionado con el metabolismo tubular renal del ácido úrico. Como ya hemos explicado en la introducción, el urato filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal gracias a la existencia de un transportador de membrana de aniones que

intercambia dichos aniones con la secreción de radicales hidroxilo. La actividad de este transportador está influenciada por múltiples factores como la presencia de otros aniones orgánicos o inorgánicos, que aumentan o reducen su eficacia, o el intercambiador de sodio por hidrogeniones<sup>38</sup>. Situaciones de hipoperfusión peritubular al igual que la insulina, promueven una disminución del pH intracelular que estimula la actividad del transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , con un aumento de la reabsorción tubular de sodio y un aumento de la secreción de hidrogeniones, lo que facilita la reabsorción de aniones como el urato<sup>146</sup>. De este modo, la disminución de la excreción de ácido úrico y la hiperuricemia resultante son al mismo tiempo consecuencia y mecanismo de perpetuación de aumento del tono vascular.

No se han descrito alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en los diversos estudios publicados sobre la intoxicación crónica por plomo hasta la fecha, pero lo que sí es evidente es la relación entre hipertensión arterial inducida por plomo e hiperuricemia hipouricosúrica. Como describiremos más adelante, hemos encontrado trastornos hemodinámicos en los estadios más precoces de la intoxicación por plomo que podrían explicar esta relación, aunque no podemos descartar que exista efecto directo del plomo sobre el sistema de transporte del ácido úrico sito en el túbulo proximal, que por otro lado, es el segmento diana de la toxicidad tubular por este metal.

En cuanto a la disminución de la excreción renal de sodio que hemos encontrado en fases muy precoces de la exposición a plomo, descartadas alteraciones en el eje renina angiotensina aldosterona, sólo podemos especular con el origen “proximal” de dicho fenómeno de hiperreabsorción, que probablemente esté relacionado con las mismas alteraciones hemodinámicas involucradas en la disminución de la excreción de uratos. De acuerdo con las teorías de Guyton<sup>147</sup>, la hipertensión arterial es el resultado de incapacidad

del riñón para excretar sodio. Debido a esta alteración, la presión arterial se eleva hasta que la excreción renal de sodio iguala la ingesta del mismo. El NO juega un papel fundamental en la regulación de la natriuresis, de tal forma que el aumento en la ingesta de sodio se acompaña, en situación normal, de un significativo aumento de la producción de NO en la médula renal como ya hemos expuesto en apartados anteriores<sup>131</sup>. Es evidente la importancia del NO en el control de la hemodinámica glomerular y del feed back túbulo-glomerular y consecuentemente, en el control de la excreción renal de sodio.

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la nefropatía por plomo se han centrado fundamentalmente en el sistema NO vascular y en las isoformas endotelial e inducible de NOS, sin embargo; se ha demostrado que la intoxicación por plomo disminuye la expresión de nNOS en el sistema nervioso central, isoforma de las NOS predominante en la mácula densa renal<sup>148</sup>. Por ello, no es aventurado sospechar que el plomo pueda interferir la actividad del sistema NO renal induciendo cambios en la hemodinámica glomerular y en el control de la natriuresis.

### **3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y DISFUNCIÓN DE LA CÉLULA MUSCULAR LISA.**

Una vez demostrada la idoneidad del modelo e identificado el momento de aparición de cambios significativos en la presión arterial, se ha demostrado la existencia de una alteración en la vasodilatación dependiente e independiente de endotelio en el animal de experimentación. Esta alteración se asocia a una sobre expresión de la sintetasa endotelial de óxido nítrico y a una expresión reducida de la guanilato ciclasa soluble en la pared vascular.

La hipertensión arterial inducida por plomo es el elemento de la tríada que caracteriza la nefropatía crónica por plomo que ha recibido más atención en la literatura. Distintas consideraciones han sido invocadas para explicar la génesis de la hipertensión arterial inducida por plomo. Durante la última década, varios estudios se han centrado en la capacidad del endotelio para generar NO en este modelo de hipertensión arterial. A este respecto; se ha demostrado la existencia de una alteración en la síntesis de NO, probablemente secundaria a una disminución de la actividad de la eNOS o a un aumento del catabolismo del NO inducido por radicales libres de oxígeno<sup>137</sup>.

En nuestros experimentos, hemos observado una alteración de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio en las ratas expuestas a plomo. Paradójicamente, la expresión de la proteína eNOS, la isoforma de las NOS responsable de la vasodilatación endotelio-dependiente<sup>112</sup>, estaba incrementada en la pared vascular de las ratas expuestas a plomo. Similares a nuestros hallazgos, se ha demostrado un sobre expresión de la proteína eNOS en situaciones de hipoxia crónica y en ratas viejas asociada a una disminución de la

vasodilatación NO-dependiente inducida por Ach<sup>112,149</sup>. Existen datos en la literatura que demuestran que la proteína eNOS, aunque es constitutiva en las células endoteliales, puede ser inducida por diferentes estímulos incluyendo los estímulos mecánicos<sup>150,151</sup>. Por ello, el aumento de las fuerzas de cizallamiento sobre la pared vascular debidas a un aumento de la presión arterial puede inducir un aumento de la expresión del la eNOS en el endotelio.

Por otro lado, hemos encontrado un aumento de la expresión de caveolina-1 en la pared vascular de las ratas expuestas a plomo. Las caveolas son microdominios especializados de la membrana plasmática extremadamente abundantes en algunos tipos celulares como el endotelio vascular<sup>152</sup>. Son invaginaciones vesiculares que participan en funciones como la picnocitosis celular y el transporte de grandes moléculas. En los últimos años se ha descrito como estas estructuras intervienen además en la modulación de la actividad de varios enzimas sitios en la membrana plasmática como la eNOS<sup>91</sup>. La familia de las caveolinas es la principal estructura proteica constituyente de las caveolas, siendo la caveolina-1 la que se expresa con mayor abundancia en multitud de subtipos celulares<sup>153</sup>. Feron et al. han demostrado que la formación de complejos caveolina-eNOS disminuye la actividad de esta enzima. El aumento de calcio intracelular inducido por los agonistas de la eNOS provocaría una rotura de este complejo activando la enzima<sup>91,154</sup>. En nuestros experimentos hemos encontrado un aumento de la expresión proteica de caveolinas asociado a un aumento de la expresión de la proteína eNOS con una disminución de la respuesta vasodilatadora a Ach. Estudios in vitro previos han demostrado que una disminución de la actividad de la NOS inducida por el plomo<sup>155</sup>. Coincidentes con nuestros resultados son los publicados por Vaziri et al., quienes demuestran un incremento

en la expresión de la eNOS en la pared vascular acompañado de inhibición de la actividad de la eNOS<sup>138</sup>. El mecanismo mediante el cual el plomo ejerce esta acción es en parte desconocido. A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, el aumento en la expresión vascular de caveolinas podría estar en relación con la disminución de la actividad de la eNOS, mediante un incremento en la formación de complejos caveolina-eNOS. Sin embargo, no existen datos en la literatura que relacionen la expresión de caveolinas en la pared vascular con la exposición a plomo y los resultados de este trabajo tampoco nos permite vislumbrar el mecanismo mediante el cual el plomo es capaz de incrementar la expresión de la caveolina-1 en la pared vascular.

Independientemente de la capacidad del endotelio para generar NO, este trabajo demuestra por primera vez una alteración de la respuesta vasodilatadora a NO exógeno en las ratas intoxicadas con plomo. Este hecho se asocia con una disminución de la expresión de ambas subunidades  $\alpha_1$ - y  $\beta_1$ - de la guanilato ciclasa soluble vascular, el principal receptor del NO y responsable de la relajación de la célula muscular lisa y por tanto de la vasodilatación, en la pared vascular de las ratas expuestas a plomo.

La alteración de la relajación vascular en respuesta a un dador exógeno de NO sugiere o bien que la GCs no es funcionante, o bien que el GMPc generado es rápidamente degradado. A este respecto, la reducción en el GMPc basal y estimulado con NPS que hemos encontrado en la pared vascular de las ratas expuestas a plomo, pudiera ser atribuida a un aumento de la degradación de GMPc mediada por la fosfodiesterasa. Sin embargo, las determinaciones de GMPc se realizaron en presencia de un inhibidor genérico de fosfodiesterasas, IBMX, descartando esta posibilidad.

Estudios in vitro previos han demostrado que algunos metales pesados tales como zinc, cadmio y plomo, inhiben la actividad de las guanilato ciclasas debido a interacción con el grupo hemo de dichas enzimas<sup>105</sup>. Los resultados obtenidos con la administración del dador de NO, SNP, sugieren que no existe ningún defecto en la actividad de la GCs puesto que los incrementos de GMPc obtenidos desde la basal hasta la máxima estimulación fueron similares en los animales tratados y en los controles. Sin embargo, el contenido total de GMPc en la pared vascular en situación basal y bajo estimulación con NPS estaba significativamente disminuida en los animales expuestos a plomo. Por ello, formulamos la hipótesis sobre la posibilidad de que la intoxicación con plomo provocara una disminución de la expresión de la GCs. Los niveles de ARNm de las subunidades  $\alpha_1$ - y  $\beta_1$ - de la GCs están disminuidos en la hipertensión inducida por plomo tal y como demuestran los resultados del análisis RT-PCR. Un método cuantitativo más convencional, análisis Western blot, confirmó el descenso de la expresión de la subunidad  $\beta_1$ - de la GCs en la pared vascular de las ratas tratadas. Puesto que la presencia de ambas subunidades  $\alpha_1$ - y  $\beta_1$ - es necesaria para que la GCs sea activa, y puesto que los niveles proteicos de la subunidad  $\beta_1$ - estaban disminuidos en las ratas expuestas a plomo, la existencia de una alteración de la respuesta no dependiente de endotelio frente a NO debida a una disminución en los niveles de GCs parece probada.

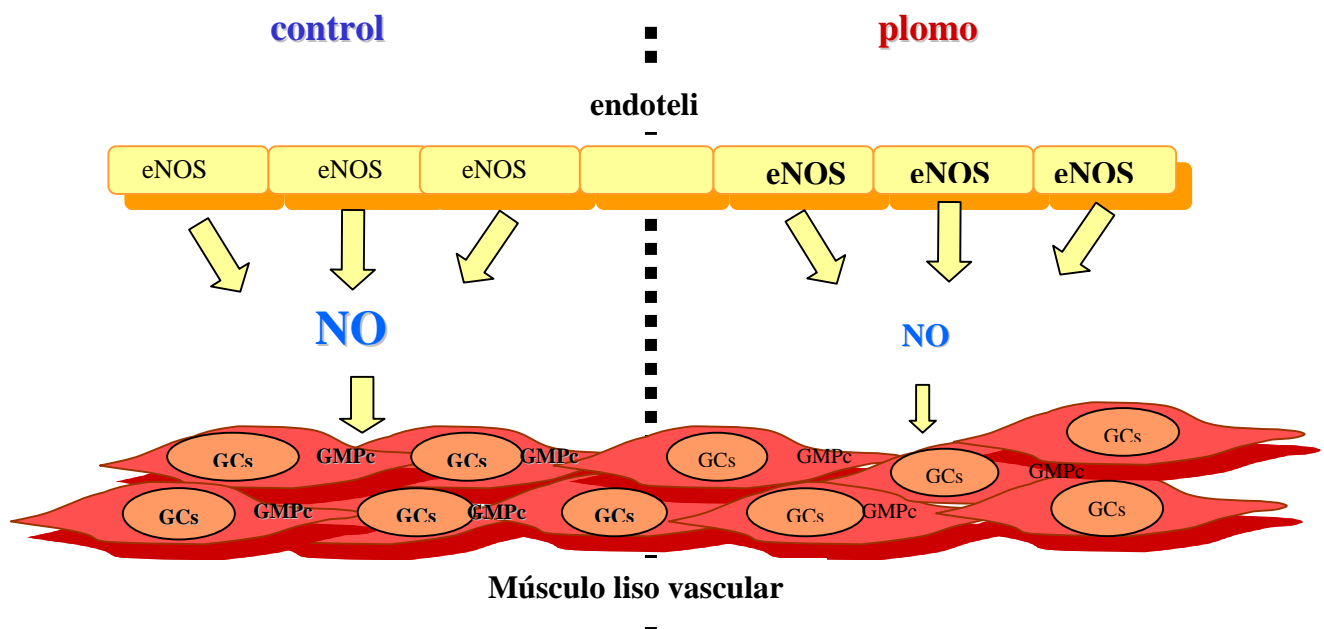
Este diseño experimental no nos permitió desvelar el o los mecanismos mediante los cuales el plomo altera la expresión de la GCs. Estudios in vitro han demostrado que los agentes estimuladores de AMPc ejercen una regulación negativa sobre la expresión de la GCs en las células musculares lisas de la pared vascular y en fibroblastos pulmonares<sup>106</sup>.



Por ello, nuevos experimentos sobre el papel del AMPc en la disminución de la expresión de la GCs tras exposición a plomo serían necesarios para esclarecer este punto.

En el siguiente esquema (Figura 16) se refleja, a modo de resumen, los distintos efectos del plomo sobre los sistemas de relajación vascular.

**Figura 16: Efectos de la intoxicación por plomo en los sistemas de relajación vascular**



*Figura 16: La intoxicación por plomo induce varias modificaciones sobre el sistema NO/GMPc vascular: provoca una disminución en la generación de NO a pesar de inducir una sobre-expresión de la eNOS en la pared vascular, disminuye la expresión de guanilato ciclasas soluble en la capa muscular vascular y consecuentemente, disminuye la generación de GMPc. Esto se traduce en disminución de la capacidad de relajación así como en aumento del tono vascular.*

Aunque los hallazgos obtenidos sobre los sistemas de relajación dependiente e independiente de endotelio se han basado en experimentos realizados en aorta, y es arriesgado extrapolar estos resultados a otros territorios vasculares, parece probable que

las alteraciones de la capacidad de relajación vascular que aparecen en la hipertensión arterial inducida por plomo y que hemos demostrado en este trabajo, pueden estar implicadas en las alteraciones de la hemodinámica intrarrenal que condicionan una alteración de la excreción de  $\text{Na}^+$  y uratos. El nexo común a ambos fenómenos sería probablemente el aparato yuxtaglomerular y el sistema constituido por la nNOS y la GC situadas a este nivel. Desconocemos si los resultados obtenidos sobre la eNOS pueden ser reproducibles en la NOS neuronal, principal isoforma de NOS localizada en el aparato yuxtaglomerular, pero parece plausible que la disminución de la expresión de GC encontrada a nivel vascular pueda aparecer también a este nivel. El fallo en el sistema de contra regulación del feedback túbulo glomerular que ejerce el NO por una vía GMPc dependiente, podría justificar el mantenimiento anómalo de un estado de hiperrabsorción de  $\text{Na}^+$ . No obstante, serían necesarios nuevos experimentos centrados en la GC renal para poder realizar de forma contundente esta afirmación.

## **VI. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Se enumeran a continuación las conclusiones extraídas de este trabajo:

- 1.** El modelo experimental de intoxicación con dosis “ultra-bajas” de plomo **emula el modelo de intoxicación medioambiental en humanos**, clínica y bioquímicamente. Con las limitaciones propias de un modelo experimental animal, este hecho permite extrapolar de los hallazgos obtenidos a lo que acontece en la práctica clínica habitual.
- 2.** Se confirma la aparición de **elevaciones significativas de la presión arterial** en fases muy precoces de la exposición, -primer mes-, anteriores a la aparición de alteraciones significativas de la función renal. Además de confirmar los resultados obtenidos por otros modelos experimentales descritos en la literatura, este dato hace sospechar que la intoxicación subclínica por este metal pueda tener un impacto mucho más relevante en la población del que se le ha atribuido clásicamente.
- 3.** La aparición de hipertensión arterial se acompaña **de alteraciones en el manejo renal de sodio y eliminación de ácido úrico**. A pesar de que los datos obtenidos en este trabajo no nos permiten identificar el origen “proximal” o “distal” de la disminución de la excreción urinaria de sodio, estas alteraciones simulan las que acontecen en algunos subtipos de la denominada “hipertensión arterial esencial”. ¿Hasta qué punto la intoxicación medioambiental por plomo es responsable de la aparición de estas formas de hipertensión arterial esencial en la población urbana?. Aunque parece evidente que existan factores de susceptibilidad individual, este es un punto que queda por esclarecer.

4. La exposición a plomo provoca **alteración de la relajación dependiente de endotelio** de forma simultánea a la aparición de elevación significativa de la presión arterial. Esto se acompaña de una sobre-expresión de la sintetasa endotelial de óxido nítrico a pesar de lo cual la generación de NO está disminuida, lo que sugiere un déficit en la actividad de dicho enzima. El aumento en la expresión tisular de alfa-1-caveolina inducida por la exposición a plomo, puede explicar la inactivación de la eNOS vascular, dato hasta ahora no descrito en la literatura.
5. La exposición a plomo induce **disminución de la síntesis de ambas subunidades de la guanilato ciclasa soluble en la pared vascular**. Esto se traduce en una disminución de la expresión proteica de la enzima y en una disminución de la generación de GMPc en la pared vascular, lo que demuestra una alteración de la relajación independiente de endotelio o lo que es lo mismo, de la respuesta al NO previamente generado. Esta alteración provoca disminución de la capacidad de relajación así como aumento del tono vascular, lo que parece claramente relacionado con la génesis de hipertensión arterial inducida por plomo.

Para finalizar, el plomo es capaz de alterar varios de los sistemas enzimáticos implicados en la relajación vascular lo que hace que el conocimiento de la fisiopatología de la hipertensión arterial inducida por este metal sea extremadamente complejo y esté aún en parte por resolver. Este trabajo aporta algunos conocimientos novedosos en esta materia; conocimientos que esperamos, en un futuro no muy lejano, puedan tener alguna repercusión en la detección y tratamiento de esta patología.

## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***

- 
- <sup>1</sup> Behringer D, Craswell P, Mohl C, et al. Urinary lead excretion in uremic patients. *Nephron* 1986; 42:323-329.
- <sup>2</sup> Ritz E, Mann J, Stoepler M. Lead and the kidney. *Adv Nephrol* 1988; 17:241-274.
- <sup>3</sup> Weeden RP, Mallik DK, Batuman B. Detection and treatment of occupational lead nephropathy. *Arch Intern Med* 1979; 139:53-57.
- <sup>4</sup> Koster J, Erhardt A, Stoepler M, Mohl C, Ritz E. Mobilizable lead in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Invest* 1989; 19: 228-233.
- <sup>5</sup> Van de Vyver F, D'Haese PC, Visser W, et al. Bone lead in dialysis patients. *Kidney Int* 1988; 33:601-607.
- <sup>6</sup> Sánchez-Fructuoso A, Torralbo A, Arroyo M, et al. Occult lead intoxication as a cause of hypertension and renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:1775-1780.
- <sup>7</sup> Morozumi M, Chow TJ, Patterson C, et al. Chemical concentrations of pollutant aerosol, terrestrial dusts and sea salts in Greenland and Antarctic snow strata. *Geochimica Cosmochimica Acta* 1969; 38:1247-1261.
- <sup>8</sup> Gerson B. Lead. *Clinical laboratory in Medicine*, 1990;10:441-457.
- <sup>9</sup> OMS: World health organization regional office for Europe. *Air quality guidelines for Europe, WHO regional publications, European series 23*. Editor Copenhagen, Denmark: World Health Organization, 1987; 242-261.
- <sup>10</sup> Staessen JA, Lauwerys RR, Buchet JP, Bulpitt CJ, Rondia D, Vanrenterghem Y, Amery A. Cadmibel Study Group: Impairment of renal function with increasing blood lead concentrations in the general population. *N Eng J Med* 1992; 327:151-156.
- <sup>11</sup> Bacon APC, Froome K, Gent AE, et al. Lead poisoning from drinking soft water. *Lancet* 1967; 264-266.
- <sup>12</sup> Kaminsky P, Leone J, Duc M. Incidence du saturnisme hydrique dans un service de médecine interne en région de sols acides. *Presse Méd* 1988; 17:419-422.

- 
- <sup>13</sup> Otero A, Mora B, Cao M, Rodríguez L. Epidemiología de la intoxicación por plomo de agua domiciliaria y saturnismo. Valoración de los parámetros para el estudio de grandes poblaciones. *Rev San Hig Pub* 1987; 61:799-810.
- <sup>14</sup> Villanueva E. Plomo. *Medicina Legal y Toxicología*. Editor Gisbert Calabuig JA. ed. Salvat 1985; 728-732.
- <sup>15</sup> Vives J, Bellet H, Lapinsky H et. al. Alcoholisme chronique et intoxication saturnine. *Gastroenterol Clin Biol*. 1980; 4:119-122.
- <sup>16</sup> Morgan JM, Hartley MW, Miller RE. Nephropathy in chronic lead poisoning. *Arch Intern Med* 1966; 118:17.
- <sup>17</sup> Montgomery R, Finkenbine R. A brief review of Moonshine use. *Psychiatr Ser* 1999; 50:1088
- <sup>18</sup> Kiostial K, Simonovic Y, Pisonic M. Lead absorption from intestine in new born rats. *Nature* 1971; 223:564.
- <sup>19</sup> Waldron HA. Lead poisoning from cosmetics. *Lancet*; 1979; 2:1070-1071.
- <sup>20</sup> Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest* 1976; 58: 260-270.
- <sup>21</sup> Yu T, Berger L, Dorph DJ, Smith H. Renal function in gout. V Factors influencing the renal hemodynamics. *Am J Med* 1979; 66:766-771.
- <sup>22</sup> Vander AJ, Mouw DR, Cox J, Johnson B. Lead transport by renal slices and its inhibition by tin. *Am J Physiol* 1977; 233:F532-538.
- <sup>23</sup> Makino S, Tsuruta H, Takata T. Relationship between blood level and urinary ALA level in workers exposed to very low levels of lead. *Ind Health* 2000; 38:95-8.
- <sup>24</sup> Goyer RA, Wilson MH. Lead-induced inclusion bodies. Results of ethylenediaminetetraacetic acid treatment. *Lab Invest* 1975; 32:149-156.
- <sup>25</sup> Lanceraux E. Observation princeps, citado por Pasteur Vallery Radot, *Gazette Medicale de Paris* 1862.
- <sup>26</sup> Blackman S. Intranuclear inclusion bodies in the kidney and liver caused by lead poisoning. *Bull John Hopkins Hosp* 1936; 58:384-398.
- <sup>27</sup> Emmerson BT. Chronic lead nephropathy. *Kidney Int* 1973; 4:1-5.



- 
- <sup>28</sup> Cramer K, Goyer RA, Jagenburg R, Wilson M. Renal ultrastructure, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. *Br J Ind Med* 1974; 31:113-127.
- <sup>29</sup> Oskarson A, Fowler BA. Effects of inclusion bodies on subcellular distribution of lead in rat kidney: the relationship to mitochondrial function. *Exp Moll Pathol* 1985; 43:397-408
- <sup>30</sup> Galle P, Morel-Maroguer L. Les lésions rénales du saturnisme humain et expérimental. *Nephron* 1965; 2:273-286..
- <sup>31</sup> Clarkson TW, Kench JE. Urinary excretion of amino acids by men absorbing heavy metals. *Biochem J.* 1956; 62:361.
- <sup>32</sup> Hong CD, Hanenson IB, Lerner S, Hammond PB, Pesce AJ, Pollak VE. Occupational exposure to lead: effects on renal function. *Kidney Int* 1980; 18:489-494.
- <sup>33</sup> Kahn HA, Medalie JH, Neufeld NH, et al. The incidence of hypertension and associated factors. The Israeli Ischemic Heart Disease Study. *Am Heart J* 1972; 84:171-182.
- <sup>34</sup> Ward HJ. Uric Acid as an independent risk factor in the treatment of hypertension. *Lancet* 1998; 352:670-671.
- <sup>35</sup> García Puig J, Ruilope LM. Ácido Úrico e hipertensión arterial. *Medicina Clínica* 2000; 114:34-38.
- <sup>36</sup> Messerli FH, Frohlich DE, Dresslinski GR, Suarez DH, Aristimuno GG. Serum uric acid in essential hypertension: An indicator of renal vascular involvement. *Ann Intern Med* 1980; 93:817-821.
- <sup>37</sup> Ruilope LM, Campo C, Rodríguez-Artalejo F, Lahera V, García Robles R, Rodicio JL. Blood Pressure and renal function: therapeutic implications. *J Hypertens* 1996;14:1259-1263.
- <sup>38</sup> Puig JG, Miranda ME, Mateos FA, Picazo ML, Jiménez ML, Calvin TS, Gil AA. Hereditary nephropathy associated with hyperuricemia and gout. *Arch Intern Med* 1993;153:357-365.
- <sup>39</sup> Maesaka JK, Fishbane S. Regulation of renal urate excretion: a critical review. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:917-933.
- <sup>40</sup> García Puig J, Ruilope LM. Ácido úrico e hipertensión arterial. *Medicina Clínica* 2000;114:34-38.
- <sup>41</sup> Kanabrocki E, McCormick JB, Hermida RC, et al. Circadian relationship of serum uric acid and nitric oxide. *JAMA* 2000; 283:2240-2241.

- 
- <sup>42</sup> Kahlil-Manesh F, Gonick H, Cohen A, Alinovi R, Bergamaschi E, Muti A, Rosen V. Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high dose lead administration. *Kidney Int* 1992; 41:1192-1203.
- <sup>43</sup> Fowler BA, Kimmel CA, Woods JS, McConnell EG, Grant LD. Chronic low level lead toxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56:59-77.
- <sup>44</sup> Kahlil- Manesh F, Gonick H, Cohen A, Alinovi R Bergamaschi E, Muti A, Rosen V. Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high dose lead administration. *Kidney Int* 1992; 41:1192-1203.
- <sup>45</sup> Sanchez-Fructuosos A. Nefropatía por Plomo. Tesis doctoral. Facultad de Medicina U. Complutense de Madrid; 1994.
- <sup>46</sup> Kahlil- Manesh F, Gonick H, Weiler EWJ, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertension* 1993; 6:723-729.
- <sup>47</sup> McAllister R, Michelakis A and Sandstead H. Plasma renin activity in chronic plumbism. *Ann Intern Med* 1971; 127: 919.
- <sup>48</sup> Victory W, Vander A, Shulak J, Schoeps P, Julius S. Lead, hypertension and the renin-angiotensin system in rats. *J Lab Clin Med* 1982; 99:354.
- <sup>49</sup> Jarrar BM, Mahmoud ZN. Histochemical demonstration of changes in the activity of hepatic phosphatases induced by experimental lead poisoning in male white rats. *Toxicol Ind Health* 2000; 16:7-15.
- <sup>50</sup> Erskine PT, Duke EMH, Tickle IJ, et al. MAD analysis of yeast 5-aminolaevulinate dehydratase: their use in structure determination and in defining the metal binding sites. *Biol Crystallography* 2000; 56:421-430.
- <sup>51</sup> Hammersen F, Hammersen E. Some structural and functional aspects of endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 1985; 80: 491-501.
- <sup>52</sup> Davies PF, Tripathi SC. Mechanical stress mechanisms and the cell: an endothelial paradigm. *Circ Res* 1993; 72: 239-244.
- <sup>53</sup> Wagner R, Chen SC. Transcapillary transport of solute by the endothelial vascular system: evidence from thin serial section analysis. *Microvas Res* 1991; 42: 139-150.
- <sup>54</sup> Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoproteins in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-1789.

- 
- <sup>55</sup> Campbell JH, Campbell GR. Biology of the vessel wall and atherosclerosis. *Clin Exp Hypertens* 1989; 11: 901-913.
- <sup>56</sup> Kuo L, Davis J, Chilian WM. Endothelial modulation of arteriolar tone. *News Physiol Sci* 1992; 7:5-9.
- <sup>57</sup> Ross R, Masuda J, Raines EW. Cellular interactions, growth factors, and smooth muscle proliferation in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 598: 102-112.
- <sup>58</sup> Shirotani M, Yui ZX, Kawai C. Reestenosis after coronary angioplasty. Pathogenesis of neointimal thickening initiated by endothelial loss. *Endothelium* 1993; 1:5-22.
- <sup>59</sup> Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
- <sup>60</sup> Ryan US, Avdonin PV, Posin EY, Popov EG, Danilov SM, Tkachuk VA. Influence of vasoactive agents on cytoplasmic free calcium in vascular endothelial cells. *J Appl Physiol* 1988; 65: 2221-2227.
- <sup>61</sup> Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrin organ. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 171-179.
- <sup>62</sup> Lüscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension?. *Hypertension* 1990; 15: 482-485.
- <sup>63</sup> Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Tox* 1984; 24: 175-197.
- <sup>64</sup> Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byns RE. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 84:9265-9269.
- <sup>65</sup> Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
- <sup>66</sup> Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, García VF. Nitric oxide: an overview. *Am J Sur* 1995; 170: 292-303.
- <sup>67</sup> Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.
- <sup>68</sup> Ignarro LJ. Byosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30:535-560.
- <sup>69</sup> Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 12231-12234.
- <sup>70</sup> Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-258.

- 
- <sup>71</sup> Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38: 4343-62.
- <sup>72</sup> Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ, Raij L, Romero JC. Effects of NG-monomethyl-L-arginine and L-arginine on acetylcholine renal response. *Hypertension* 1990; 15:659-63.
- <sup>73</sup> Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y et al. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction. *Biochemistry* 1993; 32:827-32.
- <sup>74</sup> Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8137-41.
- <sup>75</sup> Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237:893-900.
- <sup>76</sup> Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268:1114-21
- <sup>77</sup> Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993; 7:1124-34.
- <sup>78</sup> Green LC, Wagner DA. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
- <sup>79</sup> Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:446-51.
- <sup>80</sup> Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992; 70:705-707.
- <sup>81</sup> Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:361-374.
- <sup>82</sup> Brenner BM, Troy J, Ballerman BJ. Endothelium-dependent vascular responses: Mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 1989; 84:1373-1378.
- <sup>83</sup> Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transducing system: regulation and mechanisms for action. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178:153-75.
- <sup>84</sup> Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 1989; 3:31-36.

- 
- <sup>85</sup> Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science* 1992; 257:1273-1276.
- <sup>86</sup> Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 1993; 14:10-15.
- <sup>87</sup> Werener ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. Tetrahydrobiopterin and cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203:1-12.
- <sup>88</sup> Buga GM, Griscavage JM, Rogers EN, Ignarro LJ. Negative feed-back regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res* 1993; 73:808-12.
- <sup>89</sup> Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316:175-80.
- <sup>90</sup> Feron O, Michel JB, Sase K, Michel T. Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 1998; 37:193-200.
- <sup>91</sup> Feron o. Intracellular localization and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1999; 8:55-59.
- <sup>92</sup> Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why?. *J Clin Invest* 1997; 100:2146-52.
- <sup>93</sup> Belhasen Y, Feron O, Kaye DM, Michel T, Kelly R. Regulation by cAMP of postranslational processing and subcellular targeting of endothelial nitric-oxide synthase (type 3) in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272:11198-204.
- <sup>94</sup> Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming Y, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determines shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996; 78:750-8.
- <sup>95</sup> Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 1994; 14:10-15.
- <sup>96</sup> Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS Y and NOS III). *FASEB J* 1998; 12:773-90.

- 
- <sup>97</sup> López-Farré A, Sánchez de Miguel L, Millás Y, de Frutos T, Montón M, Sierra MP, Riesco A, Casado S. Endothelial cells inhibit NO generation by vascular smooth muscle cells. Role of transforming growth factor beta. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997; 272:H760
- <sup>98</sup> Inoue T, Fukuo K, Nakahashi T, Hata S, Morimoto S, Ogihara T. cGMP up-regulates nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; 25: 711-4.
- <sup>99</sup> Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density proteins decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270:319-24.
- <sup>100</sup> Alonso J, Sánchez-de Miguel L, Montón M, Casado S, López-Farré A. Endothelial cytosolic protein binds to the 3'-untranslated region of the endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Mol Cell Biol* 1997; 17:5719-5726.
- <sup>101</sup> Nakane M, Murad F. Cloning of guanylate cyclase isoforms. *Adv Pharmacol* 1994; 26:7-18.
- <sup>102</sup> Koesling D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J* 1991; 5:2785-91.
- <sup>103</sup> Gerzer R, Bohme E, Hoffmann R et al. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 1981; 132:71-74.
- <sup>104</sup> Craven PA, Derubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins: evidence for the involvement of the paramagnetic nitrosyl heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978; 253:8433-8443.
- <sup>105</sup> Taylor CT, Lisco SJ, Awtrey CS, Colgan SP. Hypoxia inhibits cyclic nucleotide stimulated epithelial ion transport: role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. *J Pharmacol Experiment Therapeutics* 1998; 284:568-575.
- <sup>106</sup> Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milica A, Murad F, Catravas J. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA and protein levels by cAMP elevating agents. *Hypertension* 1995; 26:696-704.
- <sup>107</sup> Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 351-7.

- 
- <sup>108</sup> Ignarro LJ, Kadowitz PJ. Pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol* 1985; 25:171-191.
- <sup>109</sup> Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH et al. Evidence for the inhibitory role of cyclic GMP in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981; 57: 946-955.
- <sup>110</sup> Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; 86:3375-3378.
- <sup>111</sup> Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsch A et al. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylate cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovas Res.* 1998; 37: 772-779.
- <sup>112</sup> Cernadas M, Sánchez de Miguel L, García Durán M, et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 1998; 83:279-286.
- <sup>113</sup> Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488-96.
- <sup>114</sup> Minor RL, Myers PR, Guerra R, Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 86:2109-2116.
- <sup>115</sup> Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy? *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3:S41-7. Review.
- <sup>116</sup> Elliot HL. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: risk factor, risk marker, or surrogate end point? *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3:S74-7. Review.
- <sup>117</sup> Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Effects of nitric oxide in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-61. Review.
- <sup>118</sup> Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998; 44:1799-808.
- <sup>119</sup> Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5193-7

- 
- <sup>120</sup> Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-1777.
- <sup>121</sup> Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 1995; 95:187-94.
- <sup>122</sup> Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138:S419-20. Review.
- <sup>123</sup> Libby P, Li H. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest* 1993; 92:538-9.
- <sup>124</sup> Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:77-804.
- <sup>125</sup> Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11993-11997.
- <sup>126</sup> Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localization and function. *Am J Kidney Diseases* 1994; 24:112-129.
- <sup>127</sup> Baylis C, Harton P, Engles K. Endothelial derived relaxing factor control renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1:875-881.
- <sup>128</sup> Zatt R, de Nucci G. Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am J Physiol* 1991; 261:F360-F363.
- <sup>129</sup> Ohishi K, Carmines PK, Inscho EW, Navar LG. EDRF-angiotensin II interaction in rat juxtamedullary afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 1992; 263:F900-F906.
- <sup>130</sup> Carmines PK, Morrison TK, Navar LG. Angotensine II effects on microvascular diameters of in vitro blood-perfused juxtamedullary nephrons. *Am J Physiol* 1986; 251:F610-F618.
- <sup>131</sup> Mattson DL, Shanhong LU, Nakanishi K, Papanek PE, Cowley AW. Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure. *Am J Physiol* 1994; 266:H1918-H1926.
- <sup>132</sup> Sigmon DH, Beierwaltes WH. Renal nitric oxide and angiotensin II. Interaction in renovascular hypertension. *Hypertension* 1993; 92: 237-242.



- 
- <sup>133</sup> Ollerstam A, Pittner J, Persson A, Thorup C. Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest* 1997; 99:2212-2218.
- <sup>134</sup> Ren YiLin, Garvin J, Carretero O. Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. *Kid Int* 2000; 58:2053-2060.
- <sup>135</sup> Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90:278-281.
- <sup>136</sup> Antonino RS, Kudo LH. Atrial natriuretic peptide and cGMP effects on NaCl transport in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1990; 259: F258-F268.
- <sup>137</sup> Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, Gonick H. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney Int* 1997; 52:1042-1046.
- <sup>138</sup> Vaziri N, Ding Y, Ni Z. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension* 1999; 34:558-562.
- <sup>139</sup> Arroyo M, Martínez Serrano J, Pérez Cuadrado S. Determinación analítica conjunta de plomo y cadmio en viales de Ristocell. *Med y Seg del trabajo* 1989; 36:13-20.
- <sup>140</sup> Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular muscle cells in situ. *Nature* 1976; 260:617-619.
- <sup>141</sup> Laemmli NK. Change of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- <sup>142</sup> López-Farré A, Sánchez de Miguel L, Caramelo C, Gómez García J, García R, Mosquera JR, de Frutos T, Millás I, Rivas F, Echegarreta G, Casado S. Role of nitric oxide in the autocrine growth and apoptosis of endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 272:H760-H768.
- <sup>143</sup> Gallego MJ, García Villalón, López Farré A, García JL, Garrón MP, Gómez B, Casado S, Hernando L, Caramelo C. Mechanisms of the endothelial toxicity of Cyclosporine A. *Circ Res* 1994; 74:477-484.
- <sup>144</sup> McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985; 312:159-163.

- 
- <sup>145</sup> Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, Suematsu M, Zweifach B, Schim-Schonbein GW. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4754-4759.
- <sup>146</sup> Boron WF, Boulpaep EL. Intracellular pH regulation of the renal proximal tubule of the salamander. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *J Gen Physiol* 1983; 81:29.
- <sup>147</sup> Guyton AC. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol* 1990; 259:R856-R877.
- <sup>148</sup> Selvin-Testa A, Capani F, Loidl CF, Pecci-Saavedra J. The nitric oxide synthase expression of rat cortical and hippocampal neurons changes after early lead exposure. *Neurosci Lett* 1997; 236:75-78.
- <sup>149</sup> La Cras TD, Xue C, Rengasaway A, Johns RA. Chronic hypoxia up regulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270:L164-L170.
- <sup>150</sup> Nava E, López-Farré A, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, Lüsher TF. Alterations to the nitric oxide pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 1998; 16:609-615.
- <sup>151</sup> Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994; 74:349-353.
- <sup>152</sup> Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of selected macromolecules. *J Cell Biol* 1994; 127:1217-1232.
- <sup>153</sup> Parton GP. Caveola and caveolins. *Current Opinion in Cell Biology*. 1996; 8:542-548.
- <sup>154</sup> Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 1998; 273:3125-3128.
- <sup>155</sup> Mittals CK, Harell WB, Mehta CS. Interaction of heavy metal toxicant with brain constitutive nitric oxide synthase. *Mol Cell Biochem* 1995; 149/150: 269-265s.