

11205
30
rej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

INHIBICION DEL RETICULO SARCOPLASMICO
CARDIACO POR CADMIO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN CARDIOLOGIA
PRESENTA EL DOCTOR
PRIMITIVO JAVIER GARZA DE LA GARZA

Director del Curso: Dr. Ignacio Chávez Rivera
Subdirector de Enseñanza: Dr. Fausse Attié
Director de Tesis: Dr. Edmundo Chávez Cosío



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pag
Resumen	1
Introducción	2
Material y Métodos	5
Resultados	9
Discusión	20
Bibliografía	24

RESUMEN

La función del retículo sarcoplásmico cardíaco (R. S.) más afectada por el tratamiento con cadmio es la ATPasa de calcio. El cadmio a concentraciones de 3.1×10^{-7} inhibe 50% la actividad de la enzima. La salida del calcio acumulado se afecta menos, aún a concentraciones mayores de cadmio. El retículo no transporta cadmio a pesar de la semejanza en tamaño con el calcio. El cadmio se une al R.S. en cantidad máxima de 22 a 24 nmol/mg de proteína. Cuando al R.S. previamente tratado con cadmio se le añade EDTA, las funciones de ATPasa y de transporte de calcio no se recuperan a pesar de que se libera casi la totalidad del cadmio unido.

Si se añade ditioneitol (DTT), la cantidad de cadmio que se une principalmente a una proteína de alto peso molecular (300,000 Da), aumenta unas 10 veces. En condiciones de control el cadmio se une fuertemente a una proteína de masa 24,000 \pm 800 que puede ser el fosfolamban. La inhibición por cadmio es de tipo irreversible y parece ser por competencia con el sitio del calcio y la unión a grupos SH de la ATPasa y del fosfolamban.

INTRODUCCION

El sistema de retículo sarcoplásmico es un ejemplo bien conocido, de manejo del calcio esencial durante la contracción muscular (1,2). Se sabe que el retículo sarcoplásmico posee como principal proteína constituyente a la ATPasa dependiente de calcio, la cual representa entre un 60 y un 80% de las proteínas totales. Tiene como función primaria regular la concentración de calcio citoplásmico mediante el transporte de calcio hacia el retículo durante la relajación. Se conoce que la concentración del calcio en el citoplasma de las células musculares en estado de reposo es menor de 10^{-7} M, y que durante la contracción alcanza una concentración de 100 veces superior a la de reposo, es decir 10^{-5} M. En este rango de concentraciones de calcio funciona la maquinaria contráctil (3). Además la membrana del retículo contiene varias cantidades de otras proteínas como son la calsecuestrina de la cual se han reportado 2 pesos moleculares, 46 y 65 KDa, es una proteína ácida que puede ligar de 35 a 60 moles de calcio por mol de proteína con baja afinidad; el fosfolamban, que tiene un peso molecular de 22 KDa y --

cuando está fosforilado activa a la ATPasa de calcio, -- así la velocidad de transporte de calcio aumenta 2 a 3 veces su valor normal; glucoproteínas, proteolípidos y una proteína con alta afinidad por el calcio, también -- llamada M_{55} en razón de su peso molecular que es de 55 kDa, une 1 mol de calcio por mol de proteína (33).

El cadmio (Cd^{2+}) es un catión parecido al calcio -- (Ca^{2+}) por su tamaño ($Ca^{2+} = 1 \text{ \AA}$, $Cd^{2+} = .99 \text{ \AA}$) y como es buen reactivo de grupos SH por los cuales tiene gran afinidad puede servir como herramienta para el estudio de las propiedades del retículo sarcoplásmico; este metal -- que aparece en la naturaleza junto con zinc y plomo y -- por su alta resistencia a la corrosión y propiedades -- electroquímicas se aplica en electroplastia y galvanizado, plásticos, pigmentos para pinturas y baterías de cadmio niquelado; menos del 5% del metal es reciclado por -- lo que hay que tener en cuenta la contaminación del medio, que además el carbón y otros elementos fósiles contienen cadmio y su combustión lo lleva al medio. Los -- alimentos en los que se puede encontrar altas concentraciones del metal son mariscos, hígado y riñón de animales, así como el arroz y el trigo, éstos últimos por el suelo y agua llegando a acumular 1 μg de cadmio por gramo. Otra fuente de envenenamiento es el tabaco, que contiene de 1 a 2 μg de cadmio por cigarrillo, su mayor ab-

sorción es por el tracto respiratorio. De un 10 a un 40% del cadmio inhalado, se transporta en sangre ligado a -- glóbulos rojos y albúmina, su vida media es de 10 a 30 - años, por lo que es el veneno ambiental más propenso a - ser acumulado; su eliminación es por vía biliar. Se han descrito intoxicaciones agudas por inhalación de polvos y vapores. La sintomatología se caracteriza por diarrea y calambres abdominales incluso edema pulmonar. La intoxicación crónica, produce enfisema, hipertensión arte--- rial sistémica y miocardiopatías dilatadas (4,5,30).

Dado que la contracción y la relajación del músculo liso vascular y cardíaco están reguladas por los cambios de concentración de calcio ionizado en el citoplasma y - en esto el R.S. juega un papel muy importante, el propósito de nuestro trabajo fué estudiar la posible relación entre el retículo sarcoplásmico cardíaco y la intoxicación por cadmio, principalmente en el sistema cardiovascular.

MATERIAL Y METODOS

Las vesículas cerradas del retículo sarcoplásmico -- fueron obtenidas de corazón de perro, por los métodos ya descritos (6). La ATPasa total o de calcio más megnesio fue medida en un medio que contenía: 100 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 50 µM CaCl₂, 5 mM NaN₃ y cadmio como se indica en los resultados; 50 µg de la proteína - de retículo sarcoplásmico por ml se reincubaron durante 5 min a 37°C, la reacción fue iniciada por la agregación de 2 mM ATP. La reacción fue detenida 5 min más tarde por la adición de TCA frío al 5% de concentración final, -- Después se centrifugó a 3,000 xg, por 5 min., el fosfa-- to fue determinado en una alícuota por el método Tausky y Shorr. La ATPasa basal o dependiente de Mg²⁺ fue medida como se indicó arriba, excepto que en lugar de calcio se agregó 1 mM EGTA. La ATPasa dependiente de calcio se obtuvo por la diferencia entre la ATPasa total y basal. La velocidad de transporte de calcio o la captación de calcio fue determinada en un medio que contenía: 100 mM KCl, 20 mM Pipes, pH 6.8, 4 mM MgCl₂, 5 mM de oxalato de potasio y 50 µM ⁴⁵CaCl₂ (1,000 cpm/nmol Ca²), ---

el cadmio estuvo presente como se indica en los resultados. Con adición de 0.1 mg de R.S. por ml. fueron preincubadas durante 5 min. a 37°C y la reacción fué iniciada con la adición de 2mM de ATP. A los 5 min. el transporte de calcio fué detenido por filtración en filtros Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. La radioactividad fué determinada por centelleo líquido en soluciones filtradas y no filtradas, por diferencia se calculó el transporte de calcio. Se incluyeron controles sin ATP. El transporte de calcio en su fase lineal se midió con el método del Arsenazo III en un espectrofotómetro. La unión de calcio acumulada máxima fué determinada en el siguiente medio: 100 mM KCl. 20 mM Pipes, pH 6.6, 2.5 mM MgCl_2 y 12.5 μM $^{45}\text{CaCl}_2$ (2,000 cpm/nmol) y cadmio 10^{-4}M como se indica en los resultados. 0.25 mg de la proteína de R.S. por ml fueron preincubados a 30°C durante 5 min y la reacción fué iniciada por adición de 2 mM ATP. Dos min después se filtraron 0.7 ml bajo vacío y la radioactividad fué medida como ya se mencionó. La liberación de calcio fué determinada en condiciones similares como para la unión de calcio excepto que a los 2 min de reacción un volumen de 10 μl de agua conteniendo diferentes cantidades de cadmio fueron agregados y 2 min más tarde la reacción fué detenida y la radioactividad medida como ya se mencionó. Todos los experimentos fueron --

hechos en duplicado y al menos dos diferentes experimentos fueron realizados. La unión de cadmio al R.S. fué de terminada con cadmio radioactivo en un medio que contena: 100 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, cadmio entre 10^{-7} y 10^{-4} M con cadmio 115(80,000 cpm/ml), 0.1 mg de proteínas de R.S. por ml. La reacción fué iniciada -- por la adición de vesículas de R.S. a 30°C, 5 min más -- tarde una alícuota fué filtrada como ya se describió. -- Los filtros fueron lavados 4 veces con 5 ml de 0.1 M KCl frío. Los filtros se secaron y se contaron. Los controles fueron hechos sin la proteína de R.S. La radioactividad de los filtros fué comparada con las soluciones no filtradas correspondientes. La reversibilidad de la -- unión de cadmio fué determinada en un medio similar como ya se indicó con 10^{-5} M Cd^{2+} (^{115}Cd 80,000 cpm/ml). Después de 2 min de reacción 0.9 ml fueron agregados sobre 0.1 ml de agua para control, EDTA, y EDTA más DTT a una concentración final de 1 mM. Después de 10 min a 30°C -- una alícuota fué filtrada, lavada y la radioactividad de terminada como ya se mencionó. Para determinar la reversibilidad de la inhibición por cadmio sobre la ATPasa de calcio un experimento similar fué hecho pero sin cadmio. Después de 2 min de reacción de 10^{-5} M Cd^{2+} con R.S., 0.9 ml fueron agregados sobre 0.1 ml de agua, EDTA, DTT, o -- EDTA más DTT a 1 mM de concentración final. Diez min des

pués la reacción de ATPasa de calcio fué iniciada por la adición de 50 μ M de calcio más 2 mM de ATP, sobre los tu bos que contenían 1 mM de EDTA, 1 mM de calcio fué agregado para obtener concentración de calcio libre cerca de 50 μ M, los controles fueron hechos en condiciones idénti cas pero sin cadmio. La actividad de la ATPasa fué medida como ya se indicó. Para conocer el sitio de unión del cadmio, 0.2 mg de R.S. fué reaccionado con cadmio 115 a una concentración final de 10^{-5} M como antes se indicó y con DTT o EDTA como para revertir los experimentos. Después de 10 min la solución fué centrifugada a 40,000 xg durante 30 min. El sobrenadante fué eliminado y el tubo se lavó cuidadosamente, el concentrado de R.S. fué disuelto en 0.1 ml de S.D.S. 1% y 0.2 M de fosfato de Na a pH 7.1 sin agentes reductores. La proteína fué colocada en tubos cilíndricos con gel de 7.5 de acrylamida para - electroforesis. Al final los geles fueron cortados en re banadas de 2 mm y la radioactividad de estos cortes fué medida como ya se describió. Los geles de control fueron usados para teñirse con azul brillante de Comassie y con el contenido de proteína conocido.

RESULTADOS

La fig. 1 muestra el efecto del cadmio sobre la actividad de la ATPasa de calcio. A las concentraciones de cadmio ensayadas entre 10^{-9} y 10^{-2} M la inhibición no fué solamente a la ATPasa dependiente de calcio sino que también a la ATPasa basal o de magnesio. La K_i para el cadmio determinada por la gráfica de Hill (Fig 1B) fué 3.1×10^{-7} M para ATPasa de calcio y 3.5×10^{-4} M para ATPasa de magnesio. La diferencia de K_i para ambas ATPasas es casi de 3 órdenes de magnitud. La fig. 2A muestra los resultados del transporte de calcio y los efectos de 10^{-7} M a 10^{-4} M de cadmio. La última concentración inhibió casi completamente el transporte de calcio. La Fig 2B muestra los resultados sobre la gráfica de Hill. La $K_{0.5}$ calculada fué de 2.6×10^{-6} M la cual indica que el cadmio es un inhibidor con afinidad similar al calcio para la ATPasa. El coeficiente de Hill fué 1.8 indicando que hay -- cooperatividad positiva en la unión del cadmio a la ATPasa de calcio. La velocidad control del calcio transportado fué de 122.3 nmol/mg de proteínas/min.

Otra función de R.S. examinada fué la unión de cal-

cio. Las concentraciones de cadmio ensayadas fueron de 10^{-8} a 10^{-4} M como se indicó en la Fig 3. El mayor nivel del transporte de calcio fué de 35 nmol de calcio/mg de proteína y a la mayor concentración de cadmio usada, se logró el 90% de inhibición para el transporte. En la Fig 3B la $K_{0.5} = 7.4 \times 10^{-6}$ fué calculada como el nivel de inhibición similar para el transporte de calcio. La liberación de calcio fué inducida con concentraciones de cadmio de 10^{-8} M a 10^{-4} M (tabla I) y esto muestra que esta función es la menos sensible ya que se libera solo el -- 57.7% del calcio acumulado dentro de las vesículas con cadmio 10^{-4} M; concentración a la cual las otras propiedades del R.S. ya se han inhibido totalmente. La unión de cadmio al R.S. fué examinada, mostrando que la unión -- máxima fué de 23.6 nmol/mg de proteína a concentraciones de cadmio de 10^{-4} M (Fig 4). La reversión de la unión de cadmio fué ensayada. Se observó que después de la adición de EDTA solamente el 1.7% de cadmio permaneció unido. Curiosamente cuando se usó el DTT encontramos un incremento en la unión del cadmio; casi todo el metal fué unido.

La combinación del EDTA más DTT muestra que el efecto del EDTA predomina y el 45.3% del cadmio permaneció unido al R.S. (tabla III). El estudio de electroforesis de proteínas en gel mostró que el cadmio está unido a --

una proteína similar al fosfolamban con peso molecular - de 24,000 Da. El gel con DTT mostró la unión de cadmio - sobre una proteína de muy alto peso molecular que pudie- ra ser el canal de calcio (mayor de 150,000 Da).

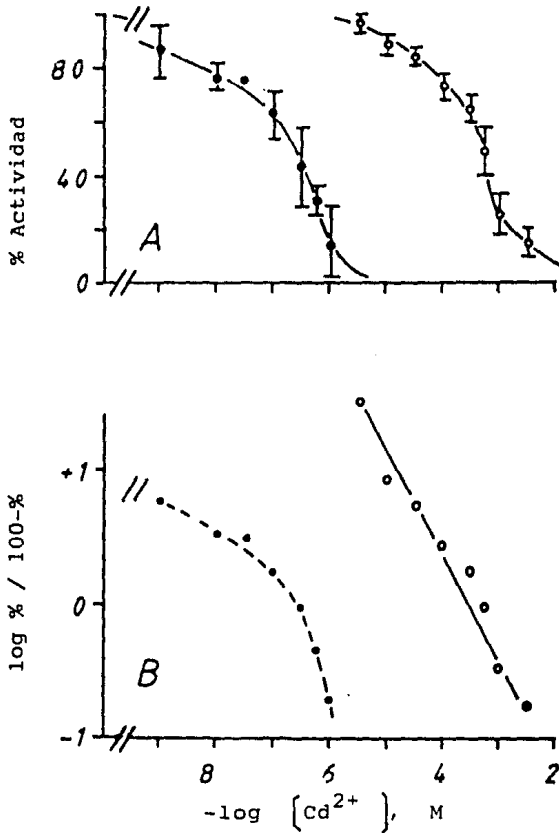


FIG. 1.- Inhibición de la ATPasa de calcio (o) y de magnesio (o) por cadmio.

A: Porcentaje de actividad en función del cadmio.

B: Gráfica de Hill

ATPasa de calcio $I_{50} = 3.1 \times 10^{-7}$ M

ATPasa de magnesio $I_{50} = 3.5 \times 10^{-4}$ M

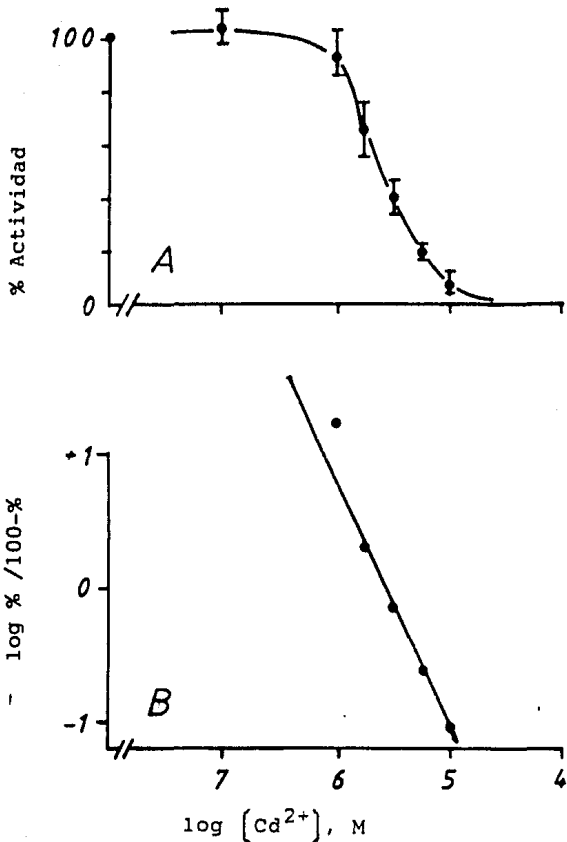


FIG. 2.- Velocidad de transporte de calcio.

A: Porcentaje de la velocidad máxima de --
transporte de calcio y la influencia --
del cadmio.

B: Gráfica de Hill

$$V_{max} = 122.3 \text{ nmol/mg/min}$$

$$I_{50} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$$

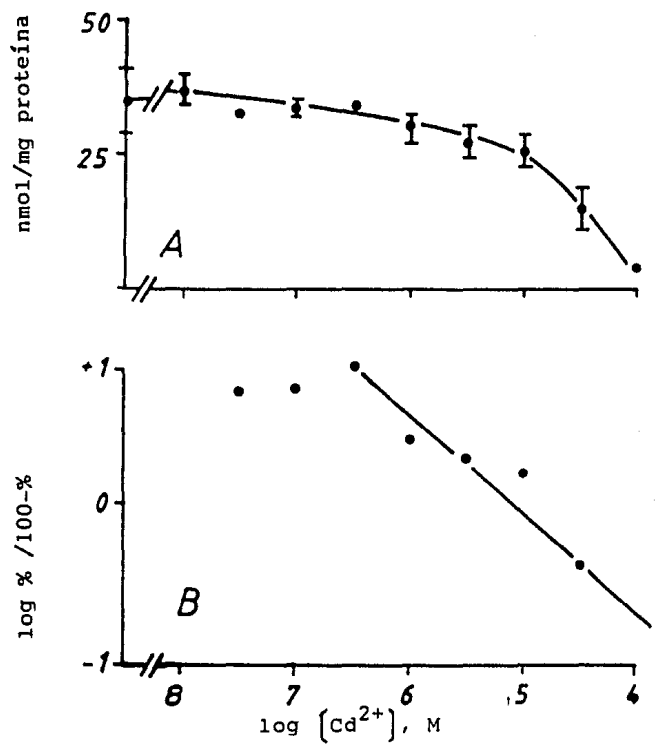


FIG. 3.- Unión de calcio al retículo sarcoplásmico.

A: Calcio unido y acción del cadmio.

B: Gráfica de Hill.

$$I_{50} = 7.4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

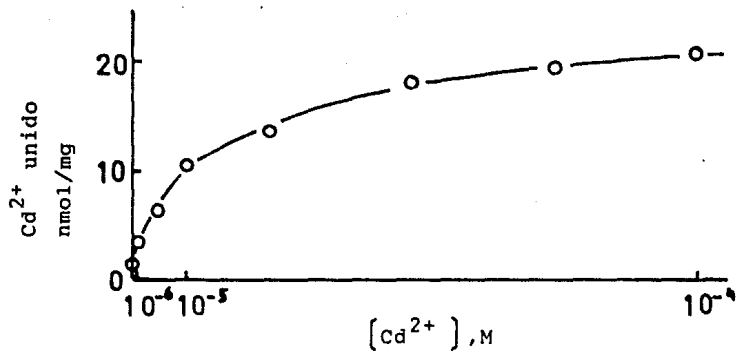


FIG. 4.- Unión de ¹¹⁵cadmio al retículo sarcoplásmico
Total 22-24 nmol/mg proteína

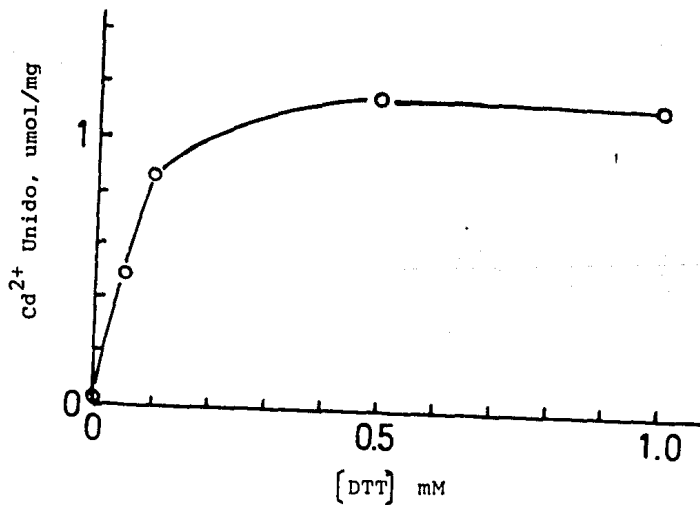


FIG. 5.- Efecto ditiotretiol (DTT) en la unión del ¹¹⁵Cd al retículo sarcoplásmico.

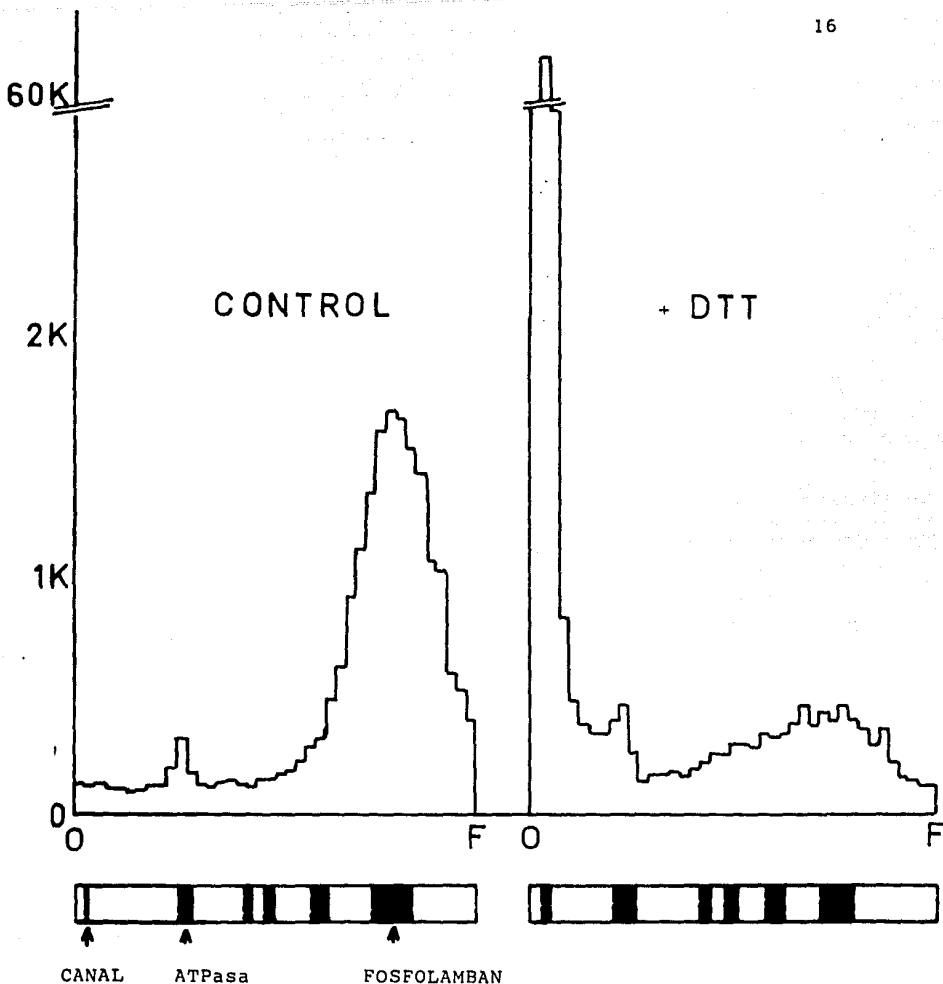


FIG. 6.- Electroforesis del retículo sarcoplásmico marcado con ^{115}Cd , (control) y con ^{115}Cd + 1mM DTT en geles de poliacridamida al 7.5%

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA I
EFECTO DEL CADMIO SOBRE EL CALCIO PREVIAMENTE
ACUMULADO POR LAS VESICULAS DEL R.S.

Cd^{2+} M	nmol/mg Ca^{2+} Remanente	%
—	15.90	100
10^{-8}	17.55	111.7
10^{-7}	17.84	113.8
10^{-6}	16.88	107
10^{-5}	11.30	67.4
10^{-4}	9.94	57.7

Nota: El valor del control sin ATP fué de 1.81 nmol/mg - de proteínas y fue restado a todos los valores. Después de 2 min de incubación en presencia de Ca, se añade Cd a las concentraciones indicadas. Después de 2 min. se filtra y se determina el Ca remanente.

TABLA II
 MODIFICACION DEL CADMIO UNIDO POR EDTA
 Y DTT

$^{115}\text{Cd}^{2+}$ UNIDO		
Adición	nmol/mg prot.	%
—	8.256	100
EDTA 1	0.141	1.7
DTT 1	88.054	1066.5
EDTA 1		
+DTT 1	3.739	45.3

Se añade ^{115}Cd , 10^{-5}M y se determinó la cantidad unida; después de dos minutos de incubación se añadió EDTA y/o DTT; a los 10 min se filtró y se determinó la cantidad de cadmio unido.

TABLA III
 REVERSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa
 DE CALCIO

ADICION (mM)	μmol ATP hidrolizado/mg prot./min.	
	Cd=0	Cd=10 ⁻⁵ M
	1.557	0.559
EDTA 1	1.276	0.636
DTT 1	1.792	0.607
EDTA 1		
+DTT 1	1.309	0.640
BASAL	0.661	0.559

Condiciones semejantes a las descritas en Tabla II, sin Cd Radioactivo. Se determinó ATPasa de Ca²⁺, en los casos donde se añadió EDTA, se ajusta Ca 1mM para medir la actividad después del tratamiento.

DISCUSION

El canal de calcio es altamente selectivo para los -- de calcio a pesar de la presencia de concentraciones relativamente altas de iones de sodio y potasio en medios fisiológicos. El cadmio es un potente bloqueador de canales de calcio en células neuronales y cardíacas (7,8). - Nuestros resultados muestran que los efectos del cadmio se extienden a todas las diferentes funciones de las vesículas de R.S. cardíaco. La función más sensible encontrada resultó ser la ATPasa dependiente de calcio. Aunque la captación de calcio es también muy sensible. La poca diferencia en K_i para estas dos actividades acopladas se debió al hecho de que el cadmio no solamente inhibió a la ATPasa dependiente de calcio sino que también a la dependiente de magnesio. A concentraciones de cad-- cercanas a 10^{-6} M, ambas funciones de ATPasa debieron ser parcialmente inhibidas, pero lo que nosotros pudimos medir fue la suma de ambas. La línea entre ambas actividades es la ATPasa medida sin calcio y con 1 mM de EGTA, y el cero la ATPasa de magnesio es tomada como el con--- trol donde se le agrega TCA antes del ATP. Cerca de la

línea entre ambas ATPasas la suma de las inhibiciones - parciales se atribuyó a una de ellas, dependiendo de los valores individuales y la K_i obtenida para la inhibición de la ATPasa dependiente de calcio no pudo ser muy exacta. Estos resultados muestran también que una vez que el calcio está dentro de las vesículas de R.S. La unión de cadmio libera este calcio solo parcialmente (tabla I) a 10^{-4} M de cadmio, donde el transporte y las actividades - de ATPasas son completamente inhibidas (Fig 1 y 2). LA unión de cadmio que vemos no interactúa fuertemente con el canal de calcio o con la membrana de lípidos y la permeabilidad del calcio es solo parcialmente afectada.

Aunque el tamaño del cadmio es similar al calcio, y - en otros organelos puede ser transportado, la ATPasa - dependiente de calcio del R.S. no es capaz de transportarlo y la unión a esta enzima es muy alta. Sin embargo como la función de la ATPasa está inhibida puede decirse que el cadmio debe estar unido fuertemente y de manera reversible a la ATPasa, en una forma que no solo la - inhibe sino que no es capaz de ser reactivada cuando casi todo el cadmio es eliminado (tabla II y III).

El papel del cadmio en pacientes hipertensos se ha - descrito desde 1964 en los trabajos en ratas de Schroeder (9). La exposición al metal durante largo tiempo, puede

puede dar origen a daño renal, desde disfunción tubular - menor hasta empeoramiento severo que involucra túbulos - así como glomérulos (10). Hay alguna evidencia sugestiva que la ingestión de bajos niveles de cadmio, por muchos - años, puede ser relevante al desarrollo de hipertensión esencial (11). Las lesiones renales inducidas por cadmio, aunque de lenta progresión, no son reversibles cuando -- cesa la exposición, estas lesiones aparecen hasta 10 o - 15 años después de la exposición (12). Glauser et al y - Khera et al reportaron mayores niveles de cadmio en san- gre en hipertensos comparados con controles normales (13, 14, 21, 22, 29).

También se han descrito alteraciones ultraestructura- les considerables en miocardio después de 12 a 15 sema-- nas de inhalación de humo de cigarro en cobayos por -- Thomsen y Kjeldsen (15). Ellos observaron cambios dege-- nerativos sobre las mitocondrias, como edema, alteraciones en el tamaño así como daño a la membrana externa de la - mitocondria. Lough también reportó alteraciones simila-- res (16, 32). Hartz et al (17, 18) en su estudio mostró -- que en hombres menores de 55 años, el cigarro se asoció con alteraciones con la movilidad difusa y segmentaria - ventricular sugiriendo que pudiera ser causa de miocar-- diopatías dilatadas.

En nuestra opinión podemos concluir, que el cadmio al

inhibir las actividades de ATPasa de calcio y el transporte del mismo, se produce un incremento intracelular del calcio ionizado, el cual como ya se mencionó es un determinante primario en la actividad contráctil del músculo liso vascular, esquelético y cardíaco, de esta manera se produce una contracción prolongada del músculo, así como anomalías en la relajación, lo que con el tiempo pudiera llevarnos a miocardiopatía dilatada, así como un aumento en el tono del músculo liso vascular, que produciría hipertensión arterial sistémica. Datos comparados con estudios realizados por Morgan JP, Grossman W y Morgan KG, en donde ellos concluyen que la incapacidad del músculo para mantener la homeostasia del calcio pueda ser una causa primaria para la disfunción contráctil. (34,35,36).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ebashi, S., Lipmann, F. Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate -- fraction of rabbit muscle. *J. Cell Biol.* 14, 389-400; 1962.
- 2.- Hasselbach, W., Makinose, M. ATP and Active transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 132-136; 1962.
- 3.- N. Ikemoto. Structure and function of the calcium -- Pump protein of sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. -- Physiol.* 44; 297-317; 1982.
- 4.- Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la -- terapéutica, cadmio. 7ª Edición, Panamericana, 1531-1533; 1986.
- 5.- Miller KD Role of cadmium and mg in pathogenesis of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Magnes. Res.* 2; 232-233; 1989.
- 6.- Meissner, G. Isolation and characterization of two -- types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. -- Biophys. Acta* 389, 51-68; 1975.
- 7.- Byerly, L., Chase, P.B. and Stimers, J.R. Permeation and interaction of divalent cations in calcium channels of snail neurones. *Journal of General Physiology* 85, 491, 1985.
- 8.- Lansman, J.B., Hess, P. and Tsien, R.W. blockade of Ca^{2+} current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} . Voltage dependence of calcium entry into -- the pore. *Journal of General Physiology* 88, 321-347. 1986.
- 9.- Schroeder HA: Cadmium Hypertension in rats. *Am J -- Physiol*; 207:62-67. 1964.
- 10.- Friberg L: Cadmium and the Kidney. *Environ Health -- perspect*; 54:1-11. 1984.
- 11.- Spieker C, Zidek W, Zumkley H: Cadmium and hypertension. *Nephron*; 47(suppl 1):34-36. 1987.
- 12.- Gompertz D, Chettle DR, Fletcher JG, et al: Renal -- dysfunction in cadmium smelters: relation to in-vivo

- liver and kidney cadmium concentrations. *Lancet*; II: 1185-1187. 1983.
- 13.- Glauser SC, Glauser EM, Bello CT: Blood cadmium in - normotensive and untreated hypertensive humans. -- 1:717-718. 1976.
 - 14.- Khera AK, Wibberly DG, Edwards KW, et al: Cadmium and lead levels in blood and urine in a series of cardiovascular and normotensive patients. *Int J Environ Stud*; 14:309-314. 1980.
 - 15.- Thomsen HK, Kjeldsen K. Threshold limit for carbon -- monoxide-induced myocardial damage. *Arch Environ -- Health*; 29:73-8. 1974.
 - 16.- Lough J. Cardiomyopathy produced by cigarette smoke. Ultrastructural observations in guinea pigs. -- *Arch Pathol Lab Med*; 102:377-80. 1978.
 - 17.- Arthur J. Hartz, et al. The association of smoking with cardiomyopathy. *N. Engl J Med*; 311:1201-1206. 1984.
 - 18.- Taylor WR. Permeation of barium and cadmium through slowly inactivating calcium channels in cat sensory neurones. *J Physiol (Lond)*; 407:433-52. 1988.
 - 19.- Paakko P, et al. Cadmium and choromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environ Res*; 49:197---207. 1989.
 - 20.- A Gvozdjakova, V Bada et al. Smoke cardiomyopathy: disturbance of oxidative processes in myocardial -- mitochondria. *Cardiovascular research*, 18, 229-232. -- 1984.
 - 21.- Helmut Geiger, et al. Role of cadmium in hypertensive patients with renal parenchymal disease. *Am J hyper-- tension*; 2:474-476. 1989.
 - 22.- Geiger H, et al. Cadmium and renal hypertension. *J. -- Hum hypertension*; 3:23-7. 1989.
 - 23.- Makoto Endo. Calcium release from the sarcoplasmic - reticulum. *Physiological Reviews*, 57:71-108, 1977.
 - 24.- A. Martonosi, R. Boland and R.A. Halpin. The biosynthesis of sarcoplasmic reticulum membranes and the mechanism of calcium transport. *Cold Spring Harbor -- Symp. Quant. Biol* 37:455-468, 1973.
 - 25.- Harol Nuñez. Músculos esquelético y cardíaco; Ultraestructura de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas; México; editorial Alhambra mexicana; 13-50, 1987.

- 26.- Michihiko Tada. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Ann. Rev. Physiol.* 44:401-23, 1982
- 27.- Michihiko Tada, Taibo Yamamoto, and Yuji Tonomura. Molecular mechanism of active calcium transport by -- sarcoplasmic reticulum; *Physiological Reviews*. 58:1--79, 1978.
- 28.- A. Martonosi. The development of sarcoplasmic reticulum membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 44:337-55, 1982.
- 29.- Beevers DG, Campell BC, Goldberg A et al: Blood cadmium in hypertensives and normotensives. *Lancet*; II:1222-1224. 1976.
- 30.- Korte F. Ecotoxicology of cadmium: general overview. *Ecotoxicol Environ Safety*; 7:3-8. 1978.
- 31.- Teleman O et al. Calcium and cadmium binding to troponin C Evidence for cooperativity. *Eur J Biochem* 15; 134:453-7. 1983.
- 32.- Morselt A F, et al. Investigation of the mechanism of cadmium toxicity at cellular level. I y II A ___ light microscopical study. *Arch Toxicol*; 52:91-108. 1983.
- 33.- J.A. Holguín. El retículo sarcoplásmico. Función y composición. *Boletín de educación bioquímica* II; 4. 1983.
- 34.- Morgan JP, Erney RE, Allen PD, Grossman W, Gwathway JK. Abnormal intracellular calcium handling: a mayor causa of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 81(suppl III):21-32. 1990.
- 35.- Grossman W, Mc Laurin LP, Rolett E1. Alterations in left ventricular relaxation and diastolic compliance in congestive cardiomyopathy. *Cardiovascular Res* 13: 514-22. 1979.
- 36.- Morgan KG, Suematsu E. The role of calcium in vascular smooth muscle tone. *Am J Hypertns* 3; 1990.