

Participación del receptor NPR-C en la activación de la sintetasa de óxido nítrico inducida por el péptido natriurético auricular en el corazón, la arteria aorta y el riñón

ROSANA ELESGARAY, MARÍA A. COSTA, MARIANO CAIMI, ANA M. BALASZCZUK, CRISTINA T. ARRANZ.

RESUMEN

En trabajos previos demostramos que la activación de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) mediaría, al menos en parte, las acciones hipotensoras, diuréticas y natriuréticas del péptido natriurético auricular (ANP).

El objetivo fue investigar el tipo de receptor natriurético y los mecanismos de señalización involucrados en la activación de la NOS en presencia de ANP.

Se trabajó con aurícula, aorta y riñón de ratas Wistar macho, previamente sacrificadas por decapitación. En dichos tejidos se midió la actividad de la NOS (pmol L-[U14C] citrulina/g tejido) utilizando L-[U14C] arginina como sustrato.

Tanto el ANP como el cANP(4-23) (agonista específico de receptores NPR-C) aumentaron la actividad de la NOS en todos los tejidos y este aumento fue mayor para el ANP en el riñón y la aorta y similar para ambos péptidos en la aurícula. Estos efectos fueron bloqueados por la nifedipina (bloqueante de canales de Ca²⁺ tipo L). La inhibición de la proteína Gi_{1,2} con toxina pertussis bloqueó el efecto del cANP sobre la enzima tanto en la aurícula y la arteria como en el riñón.

En la aurícula, la activación de la NOS mediada por el ANP se debería a la interacción del péptido con el receptor natriurético NPR-C, mientras que en el riñón y en la aorta participarían además los receptores natriuréticos NPR-A y/o B. El ANP interactuaría con el receptor NPR-C acoplado a la vía de la proteína Gi, activando la NOS Ca²⁺ dependiente.

REV ARGENT CARDIOL 2005;73:102-106.

Recibido: 2/12/2004

Aceptado: 12/03/2005

Dirección para separatas:

Dra. Cristina Arranz, Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
Junín 956, Piso 7
(1113) Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Tel. 4964-8280/8279 - int. 302

Fax 4964-8280/8279 - int. 309

e-mail: carranz@ffyb.uba.ar

Palabras clave

> Sintetasa del óxido nítrico - Péptidos natriuréticos - Corazón - Riñón

INTRODUCCIÓN

El péptido natriurético auricular (ANP) y el óxido nítrico (NO) contribuyen a la regulación de la presión arterial y la función cardíaca y renal mediante sus efectos sobre el tono vascular y sobre la homeostasis hidrosalina. (1, 2)

El NO es liberado por el endotelio vascular en respuesta a factores humorales y al aumento en las fuerzas de rozamiento. El ANP es una hormona liberada principalmente por la aurícula en respuesta al aumento de la volemia. (3, 4) Ambos mediadores poseen acciones que conducen al mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y renal, entre ellas la disminución del tono vascular y el aumento de la natriuresis y de la diuresis. Tanto el ANP como el NO inducen un aumento de los niveles de GMPc intracelular a través de diferentes vías.

Los efectos del ANP están mediados por la guanilato ciclasa acoplada a los receptores natriuréticos NPR-A y NPR-B que se expresan en la superficie de células endoteliales, músculo liso vascular de venas y arterias, segmentos del nefrón, miocitos car-

díacos, etc. (5-11) Existe un tercer tipo de receptor, NPR-C, inicialmente considerado un receptor de *clearance*, cuya distribución y abundancia en los diferentes tejidos es mayor que la de los receptores asociados con guanilato ciclasa. (12)

El NO es producido por la sintetasa de óxido nítrico (NOS), cuyas tres isoformas (eNOS, nNOS, iNOS) se expresan en el endotelio, en el músculo liso vascular, en los diferentes segmentos del nefrón y en el corazón, entre otros. Todas las NOS son activadas por su unión al complejo Ca²⁺-calmodulina. La afinidad diferencial de este complejo por la eNOS y la nNOS hace que los cambios intracelulares del Ca²⁺ libre constituyan el principal punto de control de la actividad de las mismas. Por el contrario, la mayor afinidad que presenta el complejo por la iNOS hace que el Ca²⁺ intracelular no sea un factor limitante para la actividad de la enzima inducible. (13-16) El NO actúa sobre la guanilato ciclasa soluble o citosólica, induciendo la producción de GMPc. (17) El incremento en los niveles de este segundo mensajero, así como el inducido por el ANP, a través de la guanilato ciclasa particulada o de membrana, conducen a una dismi-

nución de los niveles de calcio intracelular mediante múltiples y complejos mecanismos. (1)

El objetivo de este trabajo fue investigar el tipo de receptor natriurético y los mecanismos de señalización involucrados en la activación de la NOS inducida por el ANP en la aurícula, la arteria aorta y el riñón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios se realizaron con ratas Wistar macho cuyo peso corporal oscilaba entre los 250 y los 300 g. Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad controladas, con ciclos automáticos de luz y oscuridad de 12/12 horas y alimentados con dieta de Nutrimentos Purina y agua *ad libitum* hasta el día en que se realizaron los experimentos.

Los animales utilizados en los experimentos se trataron de acuerdo con los lineamientos de la American Heart Association sobre el uso de animales de investigación.

Las ratas se sacrificaron por decapitación y se les extrajo la aurícula, la arteria aorta y la médula y corteza renales.

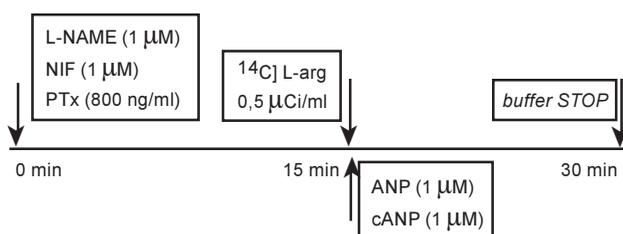
Determinación de la actividad de la sintetasa de óxido nítrico

Se incubaron cortes (2-3 mm) de los tejidos estudiados durante 30 minutos a 37°C en solución Krebs con 0,5 mCi/ml [¹⁴C] L-arginina como sustrato, que se agregaron a los 15 minutos de iniciada la incubación, según los siguientes protocolos:

1. Basal: determinación de la actividad basal de la NOS.
2. Basal + L-NAME: al iniciar la incubación se agrega L-nitroarginina metil éster (L-NAME) 1 mM, bloqueante de la NOS.
3. ANP: a los 15 minutos de iniciada la incubación, se agrega ANP 1 μM.
4. cANP: a los 15 minutos de iniciada la incubación, se agrega cANP 1 μM.
5. cANP + L-NAME: al iniciar la incubación se agrega L-nitroarginina metil éster (L-NAME) 1 mM, y a los 15 minutos, se agrega cANP 1 μM.
6. cANP + NIF: al iniciar la incubación se agrega nifedipina (NIF) 1 mM, bloqueante de canales de Ca²⁺ tipo L, y a los 15 minutos se agrega cANP 1 μM.
7. cANP + PTx: al iniciar la incubación se agrega toxina pertussis (PTx) 800 ng/ml, bloqueante de la proteína Gi_{1,2}, y a los 15 minutos, se agrega cANP 1 μM.

La reacción se detuvo con 500 μl de *buffer stop* (Hepes 20 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, pH 5,5). Los tejidos se homogeneizaron en *buffer stop* y se centrifugaron 20 minutos a 12.000 g. El sobrenadante se colocó en una columna Dowex AG 50W-X8 (Bio-Rad) eluido con 2 ml de agua destilada. La [¹⁴C] L-citrulina formada se determinó en un contador de centelleo líquido (Wallac 1414WinSpectral). La actividad de la NOS se expresó como pmol de [¹⁴C] L-citrulina/g tejido. (18)

Protocolo experimental



ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza de una variable
ANP	Péptido natriurético auricular
cANP(4-23)	Péptido natriurético auricular truncado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etilenglicol-diaminoetiléter-tetraacético
eNOS	Sintetasa del óxido nítrico endotelial
Gi _{1,2}	G inhibitoria tipo 1-2
GMPc	Guanilil monofosfato cíclico
iNOS	Sintetasa del óxido nítrico inducible
L-NAME	L-nitroarginina metil éster
NIF	Nifedipina
nNOS	Sintetasa del óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintetasa del óxido nítrico
NPR-A	Receptor natriurético tipo A
NPR-B	Receptor natriurético tipo B
NPR-C	Receptor natriurético tipo C
PTx	Toxina pertussis

Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como media ± EEM. Para el análisis de los datos se utilizó análisis de la varianza de una variable (ANOVA) seguido de la prueba *a posteriori* de múltiples comparaciones de Bonferroni. Se consideraron significativos valores de $p < 0,01$.

RESULTADOS

En las Figuras 1, 2, 3 y 4 pueden observarse los cambios inducidos por el ANP y el cANP en la actividad de la NOS en la aurícula, la aorta, la corteza y la médula renales, respectivamente. Pueden verse también los efectos sobre la actividad de la enzima en presencia de L-NAME, NIF y PTx.

En todos los tejidos ambos péptidos indujeron un aumento significativo de la actividad de la NOS, efecto que fue revertido por el inhibidor de la enzima, L-NAME, en todos los casos. El aumento inducido en la actividad de la enzima fue mayor para el ANP en el

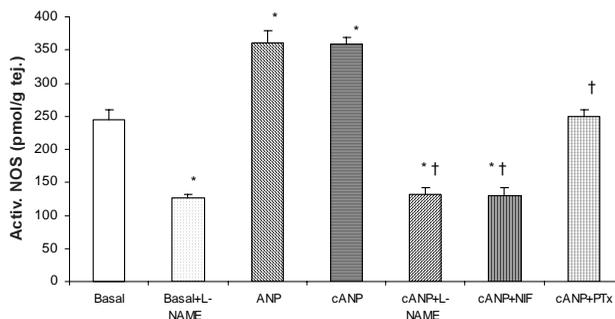


Fig. 1. Efectos del ANP(1 μM) y el cANP(4-23) (1 μM) sobre la actividad de la NOS en la aurícula en presencia de L-NAME (L-nitroarginina metil éster). NIF: Nifedipina. PTx: Toxina pertussis.

* $p < 0,01$ versus basal; † $p < 0,01$ versus cANP

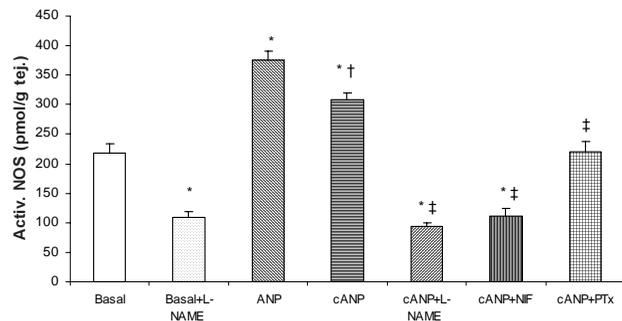


Fig. 2. Efectos del ANP ($1 \mu\text{M}$) y el cANP(4-23) ($1 \mu\text{M}$) sobre la actividad de la NOS en la aorta en presencia de L-NAME (L-nitroarginina metil éster). NIF: Nifedipina. PTx: Toxina pertussis.

* $p < 0,01$ versus basal; † $p < 0,01$ versus ANP; ‡ $p < 0,01$ versus cANP.

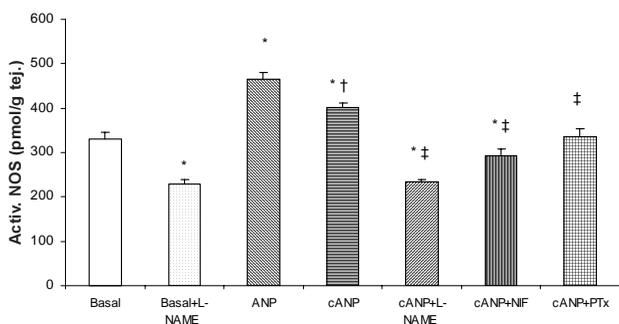


Fig. 3. Efectos del ANP ($1 \mu\text{M}$) y cANP(4-23) ($1 \mu\text{M}$) sobre la actividad de la NOS en la corteza renal en presencia de L-NAME (L-nitroarginina metil éster). NIF: Nifedipina. PTx: Toxina pertussis.

* $p < 0,01$ versus basal; † $p < 0,01$ vs ANP; ‡ $p < 0,01$ versus cANP.

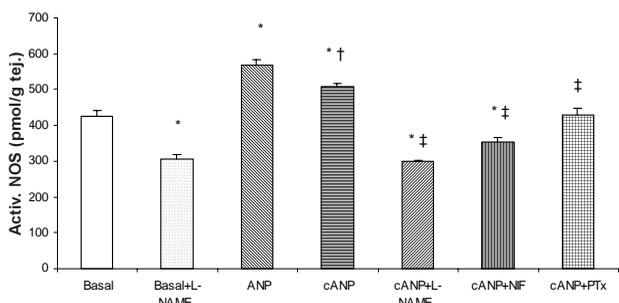


Fig. 4. Efectos del ANP ($1 \mu\text{M}$) y el cANP(4-23) ($1 \mu\text{M}$) sobre la actividad de la NOS en la médula renal en presencia de L-NAME (L-nitroarginina metil éster). NIF: Nifedipina. PTx: Toxina pertussis.

* $p < 0,01$ versus basal; † $p < 0,01$ versus ANP; ‡ $p < 0,01$ versus cANP.

riñón (Figuras 3 y 4) y en la aorta (Figura 2), y similar para ambos péptidos en la aurícula (Figura 1).

La presencia de NIF anuló el aumento de la actividad provocado por los péptidos en todos los tejidos, llevándola a valores menores que los basales.

La inhibición de la proteína $G_{i_{1-2}}$ con toxina pertussis bloqueó el efecto del cANP sobre la enzima tanto en la aurícula y en la arteria como en el riñón.

DISCUSIÓN

Si bien numerosos trabajos le asignan al receptor NPR-C una función de depuración de los péptidos natriuréticos, se ha demostrado que este receptor interviene en la activación de diversas vías de señalización asociadas con distintos efectos provocados por los péptidos natriuréticos. (19) El NPR-C se expresa en el riñón, el corazón, el endotelio y el músculo liso vascular. En cuanto a los mecanismos de señalización asociados con este receptor, se han postulado: la activación de la fosfolipasa C, la inhibición de la adenilato ciclasa y el aumento del calcio intracelular, vía proteína $G_{i_{1-2}}$. (13, 19, 20)

En trabajos previos mostramos que el efecto hipotensor inducido por el ANP estaría mediado, al menos en parte, por la activación de la NOS, a través de su interacción con los receptores NPR-A y/o NPR-B. (21) Nuestros hallazgos apoyarían los resultados de otros autores que muestran la participación del sistema GMPc/NO en la vasodilatación coronaria inducida por el ANP. (22) Además, otros investigadores sugieren que, en células endoteliales, el ANP activaría, a través del receptor NPR-C, la generación de agentes vasodilatadores, entre ellos el NO. (23, 24) Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el ANP induce aumento en la actividad de la NOS en el riñón y el corazón de rata. (25) También existen estudios *in vitro* que muestran que la liberación tónica de NO inhibiría la secreción de ANP en miocitos cardíacos. (26) Por el contrario, otros autores señalan que tanto la L-arginina como el inhibidor de la NOS L-nitroarginina metil éster (L-NAME) no tienen efecto sobre la liberación basal de ANP en el corazón perfundido de rata ni afectan la relajación ventricular dependiente de ANP. (27, 28) Brunner y colaboradores mostraron que los péptidos natriuréticos ANP y BNP, pero no el CNP, modularían la actividad de la iNOS en miocitos cardíacos. (29) Otros estudios vinculan los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la hipertensión arterial con deficiencias en la vía NO/GMPc, como también ANP/GMPc o bien con alteraciones en los receptores NPR-A, entre otros. (30, 31)

El cANP(4-23), agonista específico de receptores NPR-C, aumentó la actividad de la NOS en la aurícula, la aorta, la corteza y la médula renal, indicativo de que este receptor mediaría parte de los efectos del ANP sobre la actividad de la NOS.

Es conocido que el ANP estimula la síntesis de NO en cultivos de células tubulares proximales humanas por activación del receptor NPR-C. (32) Hussain y colaboradores sugieren que la presencia local de NO y/o ANP modulan la sensibilidad de los mediadores que participan en las cascadas de señalización de la guanililciclasa de membrana y de la guanililciclasa

citosólica. Esto indicaría que ambas enzimas regulan recíprocamente la vasorrelajación mediada por GMPc en la vasculatura humana y de algunas especies de roedores. (33)

Por otro lado, se ha descrito que el NO posee propiedades antihipertróficas en cultivos de miocitos cardíacos (34) y que el ANP también inhibe la proliferación de las células musculares lisas vasculares, probablemente debido al aumento de los niveles de GMPc. (35)

Nuestros resultados sugieren que el aumento en la actividad de la NOS por efecto del ANP en la aurícula se debería a la interacción del péptido con el receptor natriurético NPR-C. Este mecanismo estaría relacionado con la autorregulación ANP-GMPc-NO y sus acciones autocrinas y paracrinas (efectos antimitogénicos, vasorrelajantes, etc.) en el corazón.

En el riñón y en la aorta, la activación de la NOS por el ANP estaría mediada no sólo por el receptor NPR-C, sino también por los receptores natriuréticos NPR-A y/o B, participando en los mecanismos diuréticos, natriuréticos y vasodilatadores del ANP.

En todos los tejidos estudiados, el ANP interactuaría con el receptor NPR-C acoplado a la vía de la proteína Gi, activando la NOS Ca²⁺ dependiente.

Perspectivas

El ANP y el NO son dos de los sistemas que regulan las funciones cardiovascular y renal.

Dado el número creciente de trabajos de investigación que muestran la interrelación entre el ANP y el NO en individuos sanos y en condiciones fisiopatológicas, es de interés plantear el estudio exhaustivo de ambos sistemas y sus interacciones.

El conocimiento de los mecanismos de señalización involucrados permitirá la generación de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de numerosas patologías cardiovasculares, entre ellas la hipertensión y la insuficiencia cardíaca congestiva.

SUMMARY

Role of NPR-C receptor on the activation of nitric oxide synthase induced by atrial natriuretic peptide in heart, aorta artery and kidney

In previous studies we demonstrated that nitric oxide synthase (NOS) activation would mediate, at least in part, the hypotensive, diuretic and natriuretic effects of atrial natriuretic peptide (ANP).

The aim of the present study was to investigate the natriuretic receptor and the signaling pathway involve in NOS activation induced by ANP.

Wistar male rats were decapitated, and atria, aorta and kidney were extracted. Tissues NOS activity (pmol L-[U14C] citrulline/g tissue) were measured with L-[U14C] arginine as substrate.

Both ANP and cANP(4-23) (NPR-C specific agonist) increased NOS activity in the studied tissues. ANP induced a higher increase in kidney and aorta than the increase observed with cANP. These effects were blocked by nifedipine

(L-type Ca²⁺ channels blocker). Gi_{1,2} protein inhibition with Pertussis Toxin blocked cANP effect on NOS activity in atria, aorta and kidney.

NOS activation induced by ANP in atria would be due to an interaction between the peptide and the NPR-C receptor. Meanwhile this action would also involved NPR-A and/or NPR-B in aorta and kidney. ANP would interact with NPR-C receptor coupled to Gi protein, activating Ca²⁺ dependent NOS.

Key words: Nitric oxide synthase - Natriuretic peptides - Heart - Kidney

BIBLIOGRAFÍA

1. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
2. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 1997;349:1307-10.
3. Fleming I, Bauersachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1123-8.
4. Maack T. Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney Int* 1996;49:1732-7.
5. Waldman SA, Murad F. Atrial natriuretic peptides: receptors and second messengers. *Bioessays* 1989;10:16-9.
6. Maack T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 1992;54:11-27.
7. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 1990;70:665-99.
8. Nuñez DJ, Dickson MC, Brown MJ. Natriuretic peptide receptor mRNAs in the rat and human heart. *J Clin Invest* 1992;90:1966-71.
9. Totsune K, Takahashi K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Saito T, et al. Natriuretic peptides in the human kidney. *Hypertension* 1994;24:758-62.
10. Lin X, Hanze J, Heese F, Sodmann R, Lang RE. Gene expression of natriuretic peptide receptors in myocardial cells. *Circ Res* 1995;77:750-8.
11. Beltowski J, Wojcicka G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med Sci Monit* 2002;8:RA39-52.
12. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7403-8.
13. Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JG, Grider JR, Makhoul GM. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G974-80.
14. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
15. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signalling. *Biosci Rep* 1999;19:133-54.
16. Welch WJ, Wilcox CS, Thomson SC. Nitric oxide and tubuloglomerular feedback. *Semin Nephrol* 1999;19:251-62.
17. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1849-57.
18. Rosignoli F, Perez Leiros C. Activation of nitric oxide synthase through muscarinic receptors in rat parotid gland. *Eur J Pharmacol* 2002;439:27-33.
19. Levin ER. Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am J Physiol* 1993;264:E483-9.
20. Murthy KS, Teng B, Jin J, Makhoul GM. G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol* 1998;275:C1409-16.

21. Costa MD, Bosc LV, Majowicz MP, Vidal NA, Balaszczuk AM, Arranz CT. Atrial natriuretic peptide modifies arterial blood pressure through nitric oxide pathway in rats. *Hypertension* 2000;35:1119-23.
22. Brunner F, Wolkart G. Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. *Microvasc Res* 2001;61:102-10.
23. Melo LG, Veress AT, Ackermann U, Sonnenberg H. Chronic regulation of arterial blood pressure by ANP: role of endogenous vasoactive endothelial factors. *Am J Physiol* 1998;275:H1826-33.
24. Elesgaray R, Costa MA, Caimi M, Balaszczuk AM, Arranz CT. Participación del receptor NPR-C en la activación de la óxido nítrico sintasa inducida por el péptido natriurético auricular en corazón, arteria aorta y riñón. *Rev Argent Cardiol* 2004;72(Supl 3):138 (Abstract).
25. De los Angeles Costa M, Elesgaray R, Loria A, Balaszczuk AM, Arranz C. Atrial natriuretic peptide influence on nitric oxide system in kidney and heart. *Regul Pept* 2004;118:151-7.
26. Leskinen H, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, Ruskoaho H. Role of nitric oxide on cardiac hormone secretion: effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release. *Endocrinology* 1995;136:1241-9.
27. Skvorak JP, Dietz JR. Endothelin and nitric oxide interact to regulate stretch-induced ANP secretion. *Am J Physiol* 1997;273:R301-6.
28. Gyurko R, Kuhlencordt P, Fishman MC, Huang PL. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H971-81.
29. Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K. Natriuretic peptides modulate nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2375-82.
30. Woodard GE, Zhao J, Rosado JA, Brown J. A-type natriuretic peptide receptor in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Peptides* 2002;23:1637-47.
31. Lee J, Kang DG, Kook H, Kim IK, Oh BS. Differentially-altered vascular guanylate cyclase isoforms in experimental hypertensive rats. *J Korean Med Sci* 1999;14:386-92.
32. McLay JS, Chatterjee PK, Mistry SK, Weerakody RP, Jardine AG, McKay NG, et al. Atrial natriuretic factor and angiotensin II stimulate nitric oxide release from human proximal tubular cells. *Clin Sci (Lond)* 1995;89:527-31.
33. Hussain MB, MacAllister RJ, Hobbs AJ. Reciprocal regulation of cGMP-mediated vasorelaxation by soluble and particulate guanylate cyclases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1151-9.
34. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 1998;101:812-8.
35. Arjona AA, Hsu CA, Wrenn DS, Hill NS. Effects of natriuretic peptides on vascular smooth-muscle cells derived from different vascular beds. *Gen Pharmacol* 1997;28:387-92.