

# Efecto calcioantagonista del factor natriurético atrial. Consideraciones sobre sus posibles implicancias terapéuticas

BELISARIO E. FERNANDEZ, MARCELO S. VATTA, LILIANA G. BIANCIOTTI,  
ANTONIO E. DOMINGUEZ, CARLOS A. FELDSTEIN

Cátedras de Fisiopatología y Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, PROSIVAD - CONICET, Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 11/92. Aceptado: 4/93

Dirección para separatas: Dr. Belisario E. Fernández, Junín 954, 5º Piso, (1113) Capital Federal, Argentina

El factor natriurético atrial es una hormona producida por las células miocárdicas. Sus efectos hipotensores son directos (induce vasodilatación e incrementa la diuresis y natriuresis) e indirectos (regula las secreciones de renina, aldosterona, vasopresina y CRF). Nosotros comprobamos que el factor natriurético atrial modula la neurotransmisión noradrenérgica a nivel de la neurona presináptica y la célula cromafín, incrementando la captación y contenido endógeno y disminuyendo la liberación, síntesis e índice de recambio de la noradrenalina. En el presente trabajo investigamos sus efectos sobre los mecanismos calciodependientes implicados en el proceso de liberación de las catecolaminas. Se determinó la liberación espontánea e inducida de noradrenalina en cortes de hipotálamo de rata y de catecolaminas en glándulas adrenales bovinas perfundidas. Se comprobó que el factor natriurético atrial actúa como un inhibidor parcial de los canales cálcicos, mostrando un efecto aditivo con diltiazem, antagonizando la liberación de catecolaminas, ya sea espontánea o inducida por diferentes mecanismos, tales como la despolarización por altas concentraciones de potasio o la estimulación de receptores nicotínicos por acetilcolina o de membrana por angiotensina II. Estos efectos se observaron tanto a nivel central —en el hipotálamo— como a nivel periférico —en la médula adrenal— inhibiendo la actividad simpática y modulando los mecanismos centrales de regulación de la presión arterial y de las secreciones neuroendocrinas. El posible empleo terapéutico de este factor en la hipertensión arterial despierta grandes expectativas por sus efectos potencialmente beneficiosos al inhibir el sistema renina-aldosterona e interferir con la descarga simpática, con una acción bloqueante parcial de los canales de calcio. Sin embargo, su vida media plasmática muy corta y el hecho de que sólo pueda administrarse por vía intravenosa limitan por el momento su uso. La introducción reciente de inhibidores de la endopeptidasa neutra, enzima que degrada al factor natriurético atrial, constituye un hecho prometedor.

La infusión del factor natriurético atrial (FNA) causa diuresis, con acentuada natriuresis y vasodilatación en ratas, perros y seres humanos.<sup>1-3</sup> Además, el FNA reduce la producción de aldosterona y bajo ciertas circunstancias también la liberación de renina; asimismo, disminuye la liberación de vasopresina y del factor liberador de corticotrofina.<sup>4, 5</sup>

La inyección en bolo del FNA humano alfa aumenta el volumen urinario, la excreción de sodio, la depuración de creatinina y la excreción de calcio, magnesio y fósforo sin pérdida significativa de potasio por la orina.

Richards y colaboradores comprobaron un efecto hipotensor bifásico después de la inyección en bolo de 100 µg de FNA en voluntarios

sanos.<sup>3</sup> Este efecto también se observó durante las inyecciones continuas del péptido y las respuestas de la presión arterial a su acción son mayores en individuos a quienes previamente se les había administrado sobrecargas salinas.<sup>6</sup> En los pacientes hipertensos, el FNA causa efectos hipotensores de mayor intensidad que en sujetos normales. La natriuresis, el aumento de la diuresis, la depuración de creatinina, la excreción de calcio, magnesio y fósforo tienen mayor significación en los hipertensos.<sup>7-11</sup> En un estudio reciente, Franco-Sáenz y colaboradores comprobaron que la infusión durante 4 horas de FNA en pacientes hipertensos causa reducción prolongada de la presión arterial sistólica sin que se produzcan cambios en la diastólica ni en el

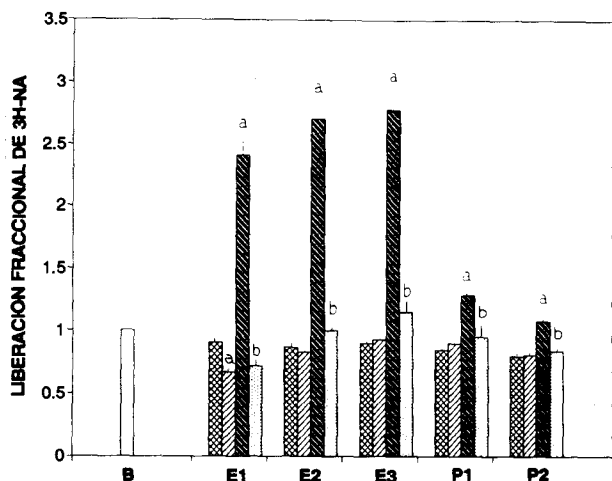


Fig. 1. Efectos del FNA sobre la liberación espontánea e inducida por acetilcolina/eserina (Ach/Es) de 3H-NA. Control (7); FNA 10 nM (7); Ach 100 μM/Es 10 μM (7); Ach 100 μM/Es 10 μM + FNA 10 nM (5). B: basal; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>: períodos experimentales; P1 y P2: períodos posexperimentales. a: p < 0,05 comparado con el grupo control; b: p < 0,05 comparado con Ach/Es.

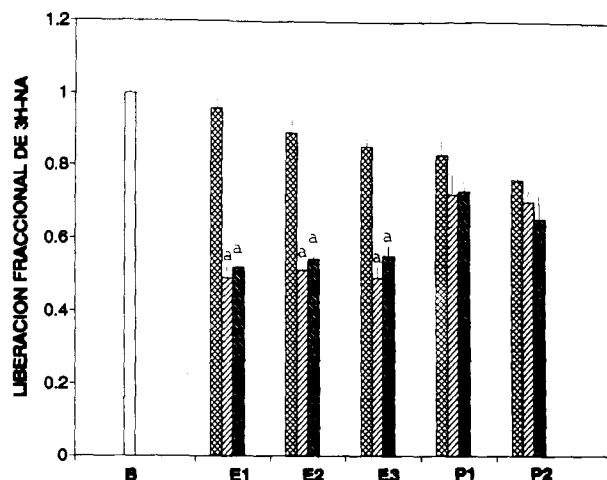


Fig. 2a. Efectos del FNA sobre la liberación de 3H-NA en un medio libre de calcio (CFM). Control (6); CEM (7); CFM + FNA 10 nM (7). a: p < 0,05 comparado con el grupo control.

volumen minuto cardíaco.<sup>12</sup>

Aunque el papel fisiológico del FNA no se conoce aún en forma completa, se ha postulado que su deficiencia puede jugar un papel preponderante en diversas condiciones, incluyendo la hipertensión arterial. Se hallaron niveles elevados de FNA en algunos pacientes con hipertensión arterial esencial, aldosteronismo primario y otras formas de hipertensión.<sup>13-16, 17</sup> Sin embargo, no se sabe hasta ahora si los niveles elevados de FNA en los hipertensos representan un mecanismo compensador de una hipertensión establecida o se deben al agrandamiento de la aurícula izquierda por una reducción de la adaptabilidad del ventrículo izquierdo.

El FNA estimula la guanilato-ciclasa y aumenta los niveles tisulares y circulantes de GMPc.<sup>18</sup> En los casos de hipertensión en los que la infusión continua de FNA provocó hipotensión sintomática, Franco-Sáenz y colaboradores no hallaron cambios significativos en las catecolaminas plasmáticas.<sup>12</sup> El desarrollo de hipotensión sin un aumento reflejo de la noradrenalina (NA) sugiere que el FNA interfiere en cierta forma con la descarga simpática. Este fenómeno fue comprobado también en perros y ratas.<sup>19, 20</sup>

En un trabajo anterior demostramos que el FNA modula la neurotransmisión noradrenérgica a nivel del terminal presináptico y la célula cromafín, incrementando la captación y contenido endógeno y disminuyendo la liberación

(espontánea e inducida), la síntesis y el índice de recambio de NA.<sup>21</sup> Estos resultados también fueron observados hace poco tiempo por Floras.<sup>22</sup>

El propósito del presente estudio fue investigar los efectos del FNA sobre los mecanismos calcio-dependientes implicados en el proceso de liberación de las catecolaminas (CA).

## METODOS

Se utilizaron dos tipos de preparación: A) de hipotálamo de ratas Wistar y B) de glándula adrenal bovina.

### A) Estudio en hipotálamo de ratas Wistar

Se emplearon ratas macho Wistar de 200-250 g de peso; los animales fueron alojados en cajas metálicas mantenidas a una temperatura de 22-24°C en una habitación con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (luz desde las 7.00 a las 19.00 hs.), con libre acceso a comida y agua.

**Protocolo:** los animales fueron decapitados entre las 10.00 y 12.00 horas para evitar las variaciones circadianas.<sup>23</sup> Se extrajo el cerebro y se disecó de inmediato el hipotálamo, procediendo a su peso y enfriamiento. Se efectuaron cortes de 1 mm que luego se transfirieron a un tubo de vidrio con malla de nylon en su región inferior para permitir el libre intercambio con el medio. Los cortes fueron preincubados en un baño termostático Dubnoff durante 15 minutos a 37°C, pH 7,4 en 2 ml de solución de Krebs burbujeada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) bajo una agitación continua. Los

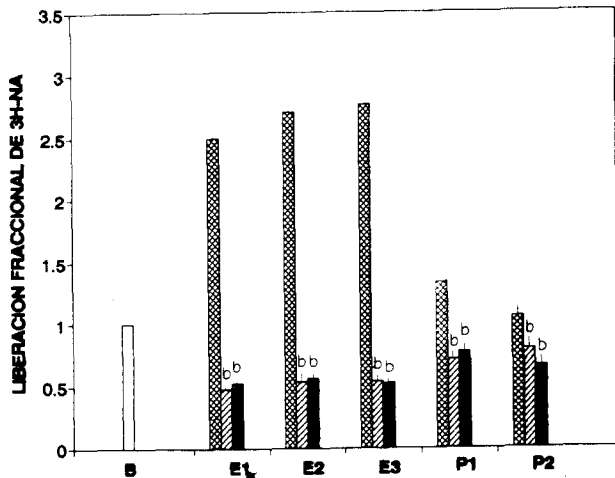


Fig. 2b. Efectos del FNA sobre la liberación de 3H-NA en un CFM en presencia de Ach/Es.  $\square$ : Ach: 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M (6);  $\square$ : CFM + Ach 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M;  $\square$ : CFM + Ach 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M + FNA 10 nM (6). b:  $p < 0,05$  comparado con Ach/Es. B: basal; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>: períodos experimentales; P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>: períodos posexperimentales.

depósitos de NA fueron marcados durante el período de incubación (30 min) con NA 0,5  $\mu$ M (2,5  $\mu$ Ci/ml).

Luego se efectuó el lavado de los tejidos durante 90 minutos con solución de Krebs (en tres períodos consecutivos de 30 minutos) para descartar la liberación extracelular (NA captada por los espacios intersticiales) y la captación extraneuronal de NA. A continuación se procedió a la incubación por 24 minutos de esos tejidos y se recolectaron 8 muestras consecutivas de ese medio (1 cada 3 minutos, cambiando siempre la solución de Krebs). Las primeras 3 muestras correspondieron al período de liberación basal; las siguientes 3 al período experimental (donde se probaron los efectos de las drogas) y las 2 últimas al período posexperimental.

En el período experimental se agregaron FNA y otras drogas para probar sus efectos sobre la liberación de NA.

Se efectuó el estudio en los siguientes grupos:

– Efectos del FNA sobre la liberación espontánea de 3H-NA: a) grupo control (incubado con solución de Krebs estándar) y b), c) y d) incubados con FNA 10, 50 y 100 nM, respectivamente.

– Efectos del FNA sobre la secreción de 3H-NA inducida por acetilcolina (Ach): a) grupo control; b) incubado con 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M eserina (Es), y c) incubado con 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es + 10 nM FNA.

– Efectos del FNA sobre la liberación de

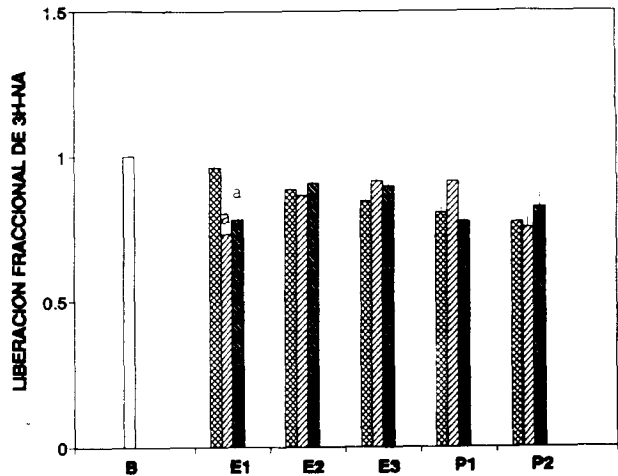


Fig. 3a. Efectos del FNA y el diltiazem (DTZ) sobre la liberación de 3H-NA.  $\square$ : Control (7);  $\square$ : DTZ 100  $\mu$ M (7);  $\square$ : DTZ 100  $\mu$ M + FNA 10 nM. a:  $p < 0,05$  comparado con el grupo control.

3H-NA en un medio libre de calcio: a) grupo control; b) incubado con un medio libre de calcio, y c) incubado con un medio libre de calcio y FNA 10 nM.

– Efectos del FNA sobre la secreción de 3H-NA en un medio libre de calcio + Ach/Es: a) incubado con un medio libre de calcio; b) incubado con un medio libre de calcio + 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es, y c) incubado con un medio libre de calcio + 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es + 10 nM.

– Efectos del FNA sobre la liberación de 3H-NA en presencia de un bloqueante de los canales de calcio: a) grupo control; b) incubado con 100  $\mu$ M de diltiazem (DTZ), y c) incubado con 100  $\mu$ M de DTZ + FNA 10 nM.

– Efectos del FNA sobre la secreción de 3H-NA provocada por Ach/Es en presencia de un bloqueante de los canales de calcio: a) incubado con 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es; b) incubado con 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es + 100  $\mu$ M DTZ, y c) incubado con 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es + 100  $\mu$ M DTZ + FNA 10 nM.

La actividad de 3H-NA en todas las muestras fue medida en un contador de centelleo Packard (modelo 240 CL/D).

Se asumió que el material radiactivo dosado corresponde a 3H-NA ya que en otros experimentos se comprobó que no había modificaciones de los porcentajes y cantidades de metabolitos.<sup>23</sup> Además, estudios recientes demostraron que el FNA inhibe la actividad de la MAO, lo que reduce la posibilidad de existencia de metabolitos de la NA.<sup>24</sup>

Para el cálculo de los resultados se consideró que la actividad de las muestras del período de

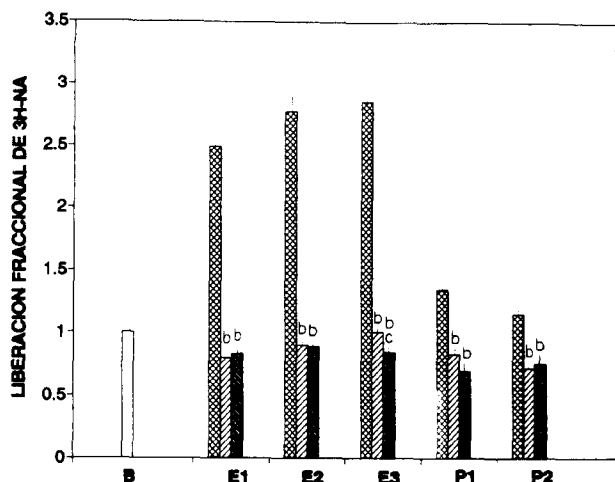


Fig. 3 b. Efecto del FNA y el diltiazem (DTZ) sobre la liberación de 3H-NA inducida por Ach/Es.  $\square$ : Ach 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M (6);  $\square$ : Ach 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M + DTZ 10  $\mu$ M (5);  $\square$ : Ach 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M + DTZ 100  $\mu$ M + FNA 10 nM (5). b:  $p < 0,05$  comparado con Ach/Es. C:  $p < 0,05$  comparado con Ach/Es + DTZ. B: basal; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>: períodos experimentales; P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>: períodos posexperimentales.

liberación basal era igual a 1 (dado que la relación entre las muestras basales de cada uno de los experimentos es 1). La liberación fraccional de cada muestra se calculó como la relación entre la liberación de 3H-NA en cada período experimental o posexperimental y la descarga basal de 3H-NA.

#### B) Estudio en glándulas suprarrenales bovinas

Las glándulas adrenales bovinas fueron perfundidas *in vitro* según el método de Trifaró y colaboradores,<sup>25</sup> modificado por nosotros. El procedimiento se efectuó a través de la arteria suprarrenal por medio de una bomba peristáltica multicanal con un flujo constante de 5 ml/min. Como existe gran variación en peso y tamaño de las glándulas suprarrenales, cada una de éstas fue utilizada como su propio control. Los fluidos de perfusión empleados fueron: a) solución estándar de Krebs-bicarbonato, b) solución libre de calcio, y c) una solución despolarizante.

En todos los experimentos, las suprarrenales fueron perfundidas durante 90 minutos con la solución estándar para lavar la sangre, descartar la liberación extracelular (del espacio intersticial) y extraneuronal, y alcanzar un estado de equilibrio de la descarga de CA (liberación basal).

Luego se efectuaron diversos experimentos para valorar los efectos del FNA, otras drogas y los diferentes medios sobre la descarga de CA.

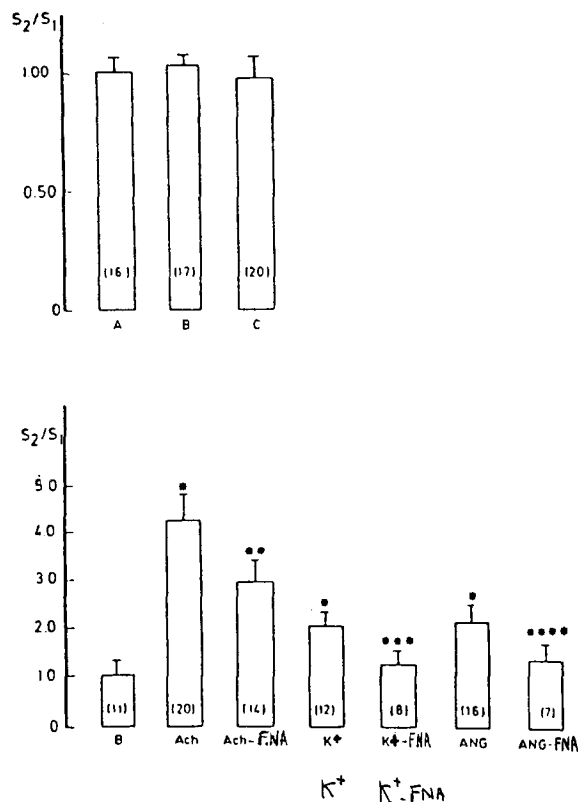


Fig. 4. El FNA 1 nM y 10 nM no modificó la liberación basal de catecolaminas (CA) por médula suprarrenal bovina (arriba), pero FNA 10 nM disminuyó la liberación de CA inducida por Ach/Es, por angiotensina II (ANG) y por potasio (K<sup>+</sup>) (abajo). \*  $p < 0,05$  comparado con B (secreción basal de Ca); \*\*  $p < 0,05$  comparado con Ach/Es; \*\*\*  $p < 0,05$  comparado con K<sup>+</sup>; \*\*\*\*  $p < 0,05$  comparado con ANG.

Se incluyeron los siguientes grupos:

– Liberación espontánea de CA: a) 1 nM FNA, y b) 10 nM FNA.

– Liberación inducida de CA: a) 100  $\mu$ M Ach/10  $\mu$ M Es; b) solución despolarizante de ClK 100 mM (K), y c) 10 nM angiotensina II. Estos medios fueron estudiados en presencia y ausencia de FNA 10 nM.

– En ausencia de calcio (medio libre de calcio): a) con FNA 10 nM y sin éste, y b) medio libre de calcio + K<sup>+</sup>, en ausencia y presencia de FNA 10 nM.

– Calcioantagonistas: a) 100  $\mu$ M verapamilo (V), y b) 10  $\mu$ M nifedipina (N), con 10 nM FNA y sin éste.

– Interacción entre el medio libre de calcio y FNA sobre la liberación de CA: a) medio libre de calcio + K<sup>+</sup> y 10 nM FNA; b) medio libre de calcio + K<sup>+</sup>; c) medio libre de calcio + 10 nM FNA; d) K<sup>+</sup> + 10 nM FNA, y e) K<sup>+</sup>.

Se obtuvieron 3 muestras de control sucesi-

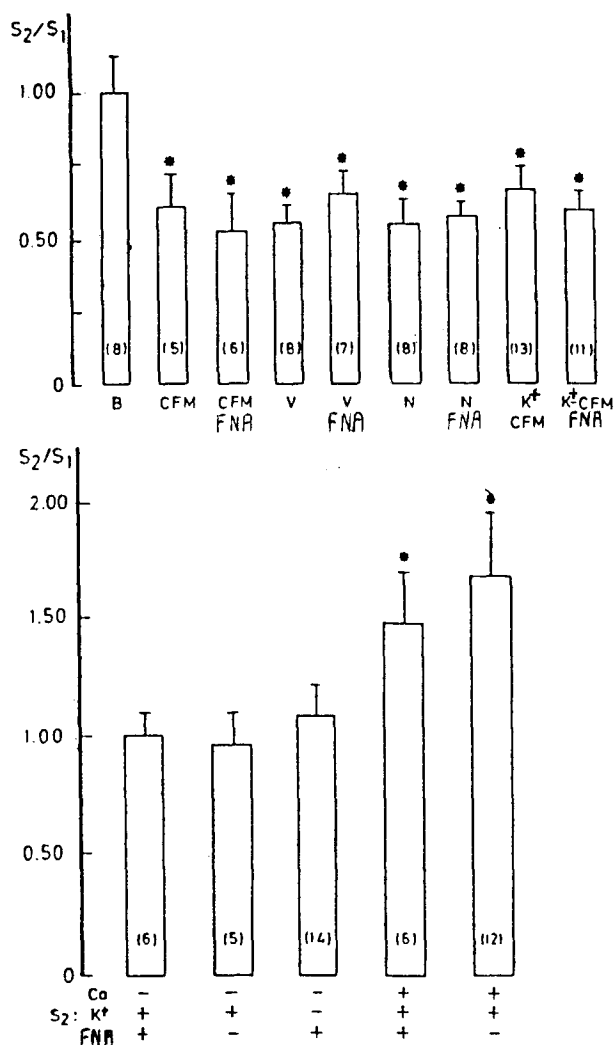


Fig. 5. En un medio libre de calcio o por efecto de calcioantagonistas (verapamilo, V; nifedipina, N) se reduce la liberación espontánea de NA por médula suprarrenal bovina (tanto en presencia o ausencia de FNA) (arriba); \*  $p < 0,05$  comparado con B (secreción basal de CA). Al agregar calcio al medio que ya contenía FNA y  $K^+$ , aumentó la liberación de CA (abajo); \*  $p < 0,05$  comparado con la primera barra.

vas, una cada 2 minutos (período de liberación basal); 5 muestras, una cada 2 minutos (período experimental) y 3 muestras, de 2 minutos cada una (período posexperimental).

La secreción de CA fue determinada en las muestras de perfusión recolectadas en tubos (enfriados con hielo) conteniendo 1 N ClH (20  $\mu$ l/ml de muestras de perfusión). El contenido total de CA fue determinado por método fluorométrico.<sup>26</sup>

Se calculó la relación S2/S1 entre la prueba y el control. S1 y S2 representan la descarga total de CA correspondiente a los períodos ex-

perimentales en la misma glándula. Cuando la composición de S2 no cambia, la relación S2/S1 es igual a 1 y esto se consideró el control, para compararlos con los diferentes grupos experimentales.

#### Drogas utilizadas y soluciones de incubación

En los experimentos se utilizaron las siguientes drogas: dl (3H) HCl NA (New England Nuclear, Boston, MA, USA) de 0,32  $\mu$ Ci/ $\mu$ g de actividad específica (en concentración de 66 Ci/M) FNA de rata (99-126; Peninsula Lab, Belmont CA, USA), acetilcolina (Ach), eserina (ES) y ácido etilenglicol-bis (amino-etilester) N, N tetraacético (EGTA) (Sigma Chem, Co, St Louis, USA); diltiazem (DTZ) (Laboratorio Roemmers, Buenos Aires, Argentina); nifedipina (N) (Laboratorio Volpino, Buenos Aires, Argentina) y verapamilo (V) (Laboratorio Knoll, Buenos Aires, Argentina).

Las soluciones para incubación fueron: a) solución estándar de Krebs-bicarbonato, con la siguiente composición (mM): ClNa, 118; ClK, 4,7; Cl<sub>2</sub>Mg, 1,2; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 1 Cl<sub>2</sub>Ca, 2,5; EDTA-Na, 0,004; dextrosa, 11,1; CO<sub>3</sub>HNA, 25,0; ácido ascórbico, 0,11; b) una solución libre de calcio similar a la solución estándar de Krebs, excepto porque el calcio fue reemplazado por una cantidad equivalente de sucrosa y 0,1 mM EGTA, que se agregó al medio.

La solución despolarizante para perfusión de suprarrenales con 100 nM de ClK tiene la misma composición que la de Krebs, pero con reducida concentración de ClNa, para mantener constante la osmolaridad.

#### Estudio estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  ES. Para el análisis estadístico se utilizaron el análisis de varianza y la prueba "t" de Student modificada por Bonferroni. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### A) Estudio en hipotálamo de rata Wistar

— Efectos del FNA sobre la liberación espontánea y provocada de 3H-NA. La concentración 10 nM FNA disminuyó la descarga espontánea de NA en el primer período experimental (3 min), mientras que en el segundo y tercer períodos experimentales (6 y 9 min) no produjo cambios (fig. 1). Con el propósito de observar los efectos del FNA 10 nM sobre la liberación inducida de NA, se efectuaron experiencias en presencia de Ach/Es. En los tres períodos ex-

perimentales y en los dos posexperimentales la descarga de NA fue reducida (fig. 1).

— Efectos del FNA sobre la liberación de NA en un medio libre de calcio: la figura 2a ilustra cómo la secreción basal de 3H-NA disminuyó en un medio libre de calcio en todos los períodos experimentales (3, 6 y 9 min), mientras que en los dos períodos posexperimentales no se observaron modificaciones, en comparación con los valores basales. Cuando se agregó FNA 10 nM al medio libre de calcio, la liberación de NA no se alteró en ninguno de los períodos estudiados, en comparación con la observada en el medio libre de calcio.

El FNA 10 nM fue incapaz de modificar las respuestas secretoras de NA provocadas por el medio libre de calcio en presencia de una concentración de 100  $\mu$ M Ach/Es, tanto en los períodos experimentales como en los posexperimentales (fig. 2b).

— Efectos del FNA sobre la descarga de NA en presencia de un calcioantagonista (DTZ): 100  $\mu$ M DTZ disminuyeron la liberación de NA sólo en el primer período experimental (3 min). Al agregar FNA 10 nM a la solución estándar de Krebs-bicarbonato conteniendo DTZ no se produjeron otros cambios en los períodos experimentales ni posexperimentales en relación con el control (fig. 3a).

La figura 3b muestra que el DTZ 100  $\mu$ M redujo la descarga de NA provocada por Ach 100  $\mu$ M/Es 10  $\mu$ M en todos los períodos (experimentales y posexperimentales). Cuando se añadió FNA 10 nM a la solución de Krebs con Ach/Es y DTZ, el péptido redujo aún más la liberación de NA en el tercer período experimental (E3) y en el primero posexperimental (P1), con respecto a lo observado por acción del DTZ.

#### B) Estudio en glándulas suprarrenales bovinas

La descarga basal de CA no fue modificada por FNA con ninguna de las concentraciones utilizadas (fig. 4, arriba). El FNA 10 nM disminuyó la liberación de CA inducida por Ach/Es, angiotensina II y  $K^+$  (fig. 4, abajo).

La figura 5, arriba, ilustra cómo un medio libre de calcio o el bloqueo de los canales de calcio con V o N redujo la liberación basal de CA. El FNA 10 nM fue incapaz de modificar la descarga de CA provocada por un medio libre de calcio o el efecto de un calcioantagonista en presencia o ausencia de soluciones despolarizantes de ClK.

La figura 5, abajo, muestra que la descarga de CA por la médula suprarrenal en un medio libre

de calcio con una concentración despolarizante de ClK y FNA, no fue modificada por la omisión del FNA o por  $K^+$ .

Cuando se restauró el calcio en el líquido de perfusión que contenía  $K^+$  y FNA, aumentó la liberación de CA. Al omitir el FNA en el último medio, se comprobó una tendencia no significativa a aumentar la descarga de CA.

#### DISCUSION

Las CA centrales —de las regiones encefálicas tales como hipotálamo, bulbo y otras áreas— intervienen en la regulación de la presión arterial y los procesos neuroendocrinos.<sup>27-29</sup>

Los péptidos vasoactivos como la angiotensina II y el FNA pueden entrar en el sistema nervioso central a través de las fenestraciones de la barrera hematoencefálica en la región vecina a los órganos circunventriculares (órganos subfornicales, órgano vasculoso lámina terminalis, área postrema).<sup>30-32</sup>

La existencia de receptores para el FNA ha sido descrita en diversas áreas del sistema nervioso central, muy relacionadas con los centros cardiocirculatorios.<sup>33</sup> Los receptores centrales del FNA pueden estar involucrados en la regulación de la presión arterial. Nosotros comprobamos previamente que el FNA modula la neurotransmisión catecolaminérgica, puesto que aumenta la captación de la NA en el sistema nervioso central y en la médula suprarrenal. Este efecto es antagonizado por las angiotensinas II y III.<sup>21, 34, 35</sup> Los receptores de FNA y de angiotensina II están ubicados en las mismas áreas del sistema nervioso central<sup>19-21</sup> que además son las responsables de la regulación de la presión arterial.<sup>33</sup> Las áreas con alta densidad inmunorreactiva al FNA se correlacionan bien con aquellas de elevada densidad de CA y angiotensina II.<sup>33, 36, 37</sup> Se ha aislado en el sistema nervioso central un factor natriurético con efectos similares al del FNA de la circulación sistémica, con secuencia homóloga de aminoácidos, pero diferente peso molecular. Esto sugirió la existencia de una síntesis local del FNA en áreas del sistema nervioso central, lo que es apoyado por el hallazgo del ARNm-FNA en extractos de cerebelo, hipotálamo y otras regiones y por la presencia de diferentes tipos de factores natriuréticos (A, B y C).<sup>38, 39</sup>

En trabajos anteriores señalamos que el FNA aumenta la captación neuronal de NA y modifica su distribución en el sistema nervioso central.<sup>21, 34</sup>

Por otra parte, Chartier y Schiffrin demostraron que en las glándulas suprarrenales de rata

el FNA bloquea la secreción y síntesis de aldosterona, previamente estimulada por angiotensina II, ACTH y soluciones despolarizantes de potasio.<sup>40</sup> Estos autores sugirieron que el FNA actuaría, al menos en parte, por interferencia con la entrada de calcio a la célula. Señalaron que ese efecto se ejerce en un sitio distal al lugar sensible a las dihidropiridinas de los canales de calcio.

Los resultados del presente estudio muestran que el FNA reduce la liberación neuronal espontánea de NA en el hipotálamo de rata. Esta reducción por parte del FNA fue mayor cuando la liberación fue inducida por Ach. Los efectos del FNA sobre la descarga de NA no se observaron cuando el medio de incubación fue privado de calcio. Esto sugiere que el FNA no bloquea por completo los canales de calcio. El FNA y el DTZ mostraron un efecto inhibitorio sinérgico cuando se estimuló la descarga de NA con Ach (fig. 3b).

En glándulas suprarrenales bovinas el FNA no modificó la liberación espontánea de CA, pero redujo la descarga inducida por Ach, soluciones despolarizantes de potasio o angiotensina II. Como se sabe, estas drogas aumentan el flujo de calcio en las células cromafines a través de los canales de calcio voltaje-dependientes.<sup>41</sup> En consecuencia, nuestros resultados sugieren que el FNA podría interactuar con los mecanismos de los canales de calcio. Los efectos del FNA sobre la descarga de catecolaminas estarían vinculados al calcio y posiblemente serían ejercidos sobre el proceso excitotóxico de la liberación de NA. En nuestros experimentos, la liberación de CA en suprarrenales cayó a niveles similares, tanto por privación de calcio en el medio de incubación como por bloqueo de los canales de calcio con V o N. Así, el FNA no mostró efectos cuando los canales no estaban activados.

Como el FNA modificó la liberación provocada (no la basal) de CA, evaluamos los efectos del FNA en presencia de ClK y un medio libre de calcio. En estas circunstancias, el FNA careció de efectos. Por lo tanto, no modifica la secreción de CA inducida por potasio cuando no hay activación de los canales de calcio.

Las posibles implicancias terapéuticas de estos hallazgos se relacionan con el empleo del FNA como agente antihipertensivo. Esta función del FNA presenta algunas similitudes con los efectos provocados por los calcioantagonistas. La acción hemodinámica más relevante de ambos es la vasodilatación con reducción de la resistencia periférica. Sin embargo, los efectos del FNA sobre el eje renina-aldosterona y catecolaminas

en sangre difieren sensiblemente de los observados con los calcioantagonistas.<sup>41, 42</sup>

La comprobación de que el efecto hipotensor del FNA es mayor en los animales con hipertensión renino-dependiente,<sup>43, 44</sup> pero que también se aprecia en otros modelos como en las ratas con hipertensión espontánea y en las que se induce por DOCA-sal,<sup>45, 46</sup> sugiere que se trata de un nuevo tipo de agente antihipertensivo.

A los mecanismos ya conocidos por los que el FNA actúa como antihipertensivo —vasodilatación, antagonismo de la acción de la angiotensina II, disminución del volumen y cambios en la distribución de fluidos—, los resultados de nuestras investigaciones agregan su efecto como bloqueante parcial de los mecanismos calcio-dependientes y su efecto aditivo con el de los calcioantagonistas sobre la liberación de NA en el sistema nervioso central y en la médula suprarrenal.

El posible empleo terapéutico del FNA en la hipertensión arterial despierta grandes expectativas, considerando los efectos potencialmente beneficiosos del péptido, que inhibe el sistema renina-aldosterona e interfiere con la descarga simpática mediante un efecto bloqueante parcial de los canales de calcio. No obstante, su vida media plasmática muy corta, y el hecho de que sólo puede ser administrado por vía intravenosa en terapéutica clínica, por ahora limitan su uso. Se están investigando nuevas vías de administración intranasal y aun oral, así como análogos más estables del FNA.

La introducción reciente de inhibidores de la endopeptidasa neutra, enzima que degrada al FNA, constituye un hecho prometedor. Se ha demostrado que esos inhibidores aumentan los niveles plasmáticos de FNA y reducen la presión arterial, tanto en animales de laboratorio como en seres humanos.<sup>47</sup>

## SUMMARY

Atrial natriuretic factor is a hormone produced mainly by atrial myocytes, whose physiological role described up to date consist in natriuresis and diuresis increase, renin-aldosterone secretion inhibition, vasopressin inhibition, and the ability to shift fluid from the intravascular to the extravascular compartment. We observed that atrial natriuretic factor modulates sympathetic neurotransmission, at presynaptic level and at chromaffin cells, increasing the uptake and reducing norepinephrine synthesis, release and turnover. The present study was designed to investigate atrial natriuretic factor effects on the calcium dependent mechanism involved in the catecholamine release process. We

demonstrated that this factor acts as a partial inhibitor of calcium channels, showing an additive effect with verapamil, nifedipine, and diltiazem. The atrial natriuretic factor decreased spontaneous and induced release of hypothalamus norepinephrine and adrenal catecholamines. Different aspects of the biological activity of atrial natriuretic factor suggest a possible role as a natural antihypertensive substance. It has potentially beneficial inhibitory effects on the renin-aldosterone system and the interference with the sympathetic drive. However, the very short half-life of this factor and the fact that it can only be given intravenously limits its therapeutic use. The recent introduction of inhibitors of neutral endopeptidase, the enzyme that degrades atrial natriuretic factor promises very exciting therapeutic possibilities.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a los Dres. M. L. Papouchado, A. S. Locatelli, R. Okobori y M. A. González por la asistencia técnica en la elaboración de este trabajo.

### BIBLIOGRAFIA

- deBold AJ, Borenstein HB, Veress AT et al: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89-94.
- Maack TD, Marion DM, Camargo MJF et al: Effect of auricularin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function and the renin aldosterone system in dogs. *Am J Med* 1984; 77: 1069-1075.
- Richards AM, Nicholls MG, Ikram H et al: Renal, hemodynamic, and hormonal effects of alpha atrial natriuretic peptide in healthy volunteers. *Lancet* 1985; 1: 545-549.
- Chartier L, Schiffrin EL, Thibault C: Effect of atrial natriuretic factor (ANF) on aldosterone secretion by adrenal glomerulose cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 122: 171-174.
- Chartier L, Schiffrin EL, Thibault G, García R: Atrial natriuretic factor inhibits the stimulation of aldosterone secretion by angiotensin II, ACTH and potassium in vitro and angiotensin II-induced steroidogenesis in vivo. *Endocrinology* 1984; 115: 2026-2028.
- Nicholls MG, Richards AM: Human studies with atrial natriuretic factor. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16: 199-223.
- Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA et al: Effect of alpha natriuretic peptide in essential hypertension. *Hypertension* 1985; 7: 812-817.
- Weidmann P, Gnadinger MP, Ziswiler HR et al: Cardiovascular, endocrine and renal effects of atrial natriuretic peptide in essential hypertension. *J Hypertens* 1986 (Suppl II): S75-S83.
- Janssen WMT, de Jong PE, van der Hem GK et al: Effect of human atrial natriuretic peptide on blood pressure after sodium depletion in essential hypertension. *Br Med J* 1986; 293: 351-353.
- Franco-Sáenz R, Somani P, Mulrow PJ: Bradycardia after infusion of atrial natriuretic factor. *Ann Inter Med* 1987; 107: 594.
- Burnett JC Jr, Kao PC, Hu DC et al: Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 1986; 231: 1145-1147.
- Franco-Sáenz R, Somani P, Mulrow PJ: Effect of atrial natriuretic peptide (8-33-Met ANP) in patients with hypertension. *Am J Hypertens* 1992; 5: 266-275.
- Sugawara A, Nakao K, Sakamoto M et al: Plasma concentration of atrial natriuretic polypeptide in essential hypertension. *Lancet* 1985; II: 1426-1427.
- Arendt R, Gerbes A, Ritter D, Stangl E: Atrial natriuretic factors in plasma of patients with arterial hypertension, heart failure or cirrhosis of the liver. *J Hypertens* 1986; 4 (Suppl II): 131-135.
- Sagnella GA, Markandu ND, Shore AC, Mac Gregor CA: Raised circulating levels of atrial natriuretic peptide in essential hypertension. *Lancet* 1986; I: 179-181.
- Zachariah PK, Burnett JC Jr, Ritter SC: Atrial natriuretic peptide in human essential hypertension. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 782-786.
- Yamaji T, Ishibashi M, Sedihara H et al: Plasma levels of atrial natriuretic peptide in primary aldosteronism and essential hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 815-817.
- Waldman SA, Rapoport RM, Murad F: Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* 1984; 259: 14332-14334.
- Holtz J, Sommer O, Bassenge E: Inhibition of sympatho-adrenal activity by atrial natriuretic factor in dogs. *Hypertension* 1987; 9: 350-354.
- Debinsky W, Kuchel O, García R et al: Atrial natriuretic factor inhibits the sympathetic nervous activity in one kidney, one clip hypertension in the rat. *Proc Soc Exp Biol and Med* 1986; 181: 173-177.
- Fernández BE, Vatta MS, Bianciotti LG, Martínez Seeber A: Atrial natriuretic peptides; effects on uptake and intracellular distribution of norepinephrine in hypothalamus. *Pharmacology (Life Sci Adv)* 1990; 9: 525-533.
- Floras JS: Sympathoinhibitory effect of atrial natriuretic in normal humans. *Circulation* 1990; 81: 1860-1873.
- Zigmond MJ, Wurtman RJ: Daily rhythm in the accumulation of brain catecholamines synthesized from circulatory tyrosine-3H. *J Pharmacol Exp Ther* 1970; 172: 416-422.
- Vatta MS, Rubio MC, Bianciotti LG, Fernández BE: El péptido natriurético auricular (PNA) inhibe la actividad de la monoamino-oxidasa. *Medicina* 1991; 51: 429 (Abstracts).
- Trifaro JM, Poisner AM, Douglas WW: The fate of chromaffin granule catecholamine release from the adrenal medulla. I. Unchanged efflux of phospholipid and cholesterol. *Biochem Pharmacol* 1967; 16: 2095-2100.
- Anton AH, Sayce DF: A study of the factors affecting oxide trihydroxyndole procedure for the analysis of catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1962; 138: 360-371.
- Chalmers JP: Brain amines and models of experimental hypertension. *Circ Res* 1975; 36: 469-480.
- Fernández BE, Domínguez AE, Vidal NA, Martínez Seeber A: Modification of arterial pressure and plasma renin: their effects on the norepinephrine content of hypothalamus and medulla oblongata. *Arch Int Physiol Biochem* 1977; 86: 287-293.
- Saavedra JM, Grobecker H, Axelrod J: Biochemical and morphologic study of catecholamine metabolism in spontaneous hypertensive rats. *Mayo Clinic Proc* 1977; 52: 391-394.
- Mendelsohn FAO, Quirion R, Saavedra JM et al: Autoradiographic localization of angiotensin II receptor in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1575-1578.
- Phillips IM: Function of angiotensin II in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 1987; 49: 413-435.
- Kurihara M, Saavedra JM, Shigematsu K: Localization and characterization of atrial natriuretic peptide binding sites in discrete areas of rat brain and pituitary gland by quantitative autoradiography. *Brain Res* 1987; 408: 31-39.
- Skofitsch G, Jakobowitz DM: Atrial natriuretic peptide in the central nervous system of the rat. *Cell Mol Neurobiol* 1988; 8: 339-391.
- Vatta MS, Bianciotti LG, Papouchado LM et al: Effects of atrial natriuretic peptide and angiotensin III on the uptake and intracellular distribution of norepinephrine in medulla



- oblongata of the rat. *Comp Biochem Physiol* 1991; *99C*: 293-297.
35. Vatta MS, Bianciotti LG, Fernández BE: Interaction between atrial natriuretic peptide and angiotensin III on norepinephrine uptake in the rat hypothalamus. *Med Sci Res* 1991; *19*: 647-648.
  36. Domínguez AE, Fernández BE, Vidal NA, Martínez Seeber A: Angiotensin II-norepinephrine relationship in the central nervous system. *Arch Int Physiol Biochem* 1982; *90*: 269-275.
  37. Saavedra JM, Correa FMA, Plunkett LM et al: Binding of angiotensin II and atrial natriuretic peptide in brain of hypertensive rats. *Nature (London)* 1986; *320*: 758-760.
  38. Inagami T, Tanaka I, McKenzie JC et al: Discovery of atrial natriuretic factor in the brain: its characterization and cardiovascular implication. *Cell Mol Neurobiol* 1989; *9*: 75-85.
  39. Rosenzweig A, Seidman CE: Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Ann Rev Biochem* 1991; *60*: 229-255.
  40. Chartier L, Schiffrin EL: Role of calcium in the effects of atrial natriuretic peptide on aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol* 1987; *252*: E485-E491.
  41. Pinto JEB, Trifaro JM: The different effects of D-600 (methoxyverapamil) on the release of adrenal catecholamines induced by acetylcholine, high potassium or sodium deprivation. *Brit J Pharmacol* 1976; *57*: 127-132.
  42. Struyker-Coudiet HAJ, Smits JFM, De Mey JGR: The pharmacology of calcium antagonists: a review *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; *15* (Suppl IV): S1-S10.
  43. García R, Thibault G, Gutkowska J et al: Effect of chronic infusion of synthetic atrial natriuretic factor (ANF 8-33) in conscious two kidney-one clip, hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; *178*: 155-159.
  44. Volpe M, Odell G, Kleinert HD et al: Effect of atrial natriuretic factor on blood pressure, renin and aldosterone in Goldblatt hypertension. *Hypertension* 1985; *7* (Suppl 1): 143-148.
  45. Lappe RW, Smits JFM, Todt JA et al: Failure of atriopeptin II to cause arterial vasodilatation in the conscious rat. *Circ Res* 1985; *56*: 606-612.
  46. Volpe M, Sosa RE, Muller FB et al: Different hemodynamic responses to atrial natriuretic factor in two models of hypertension. *Am J Physiol* 1986; *250*: H871-H878.
  47. Richards AM, Wittert G, Espiner EA et al: Prolonged inhibition of endopeptidase 24.11 in normal man: renal, endocrine and haemodynamic effects. *J Hypertens* 1991; *9*: 955-962.