



CAMINHOS DA CARDIOLOGIA

Coordenador - Luiz V. Decourt

O artigo seguinte focaliza, com pormenores, as etapas sucessivas que conduziram a uma descoberta de alta relevância em fisiologia e em patologia cardiovasculares. Em buscas que se desenvolveram por cerca de 10 anos, uma equipe canadense chefiada por A. J. de Bold conseguiu resultados que constituíram - como o próprio pesquisador acentuou - verdadeiro desafio a um conceito muito bem estabelecido: o de que as células miocárdicas sempre se apresentaram essencialmente diferenciadas para os fenômenos de excitação, de condução e de contração e não para a secreção. E, agora, revelam-se também como órgão endócrino.

Em curto comentário sobre "A descoberta do fator natriurético atrial" de Bold ressaltou três razões primárias para a alta posição do seu trabalho básico (Nature, 1985), já citado 360 vezes na literatura, até 1991: "First, the concept that the heart has an endocrine function was astonishing. Second, the published experiments were as

reproducible as they were dramatic (...) Third, the discovery of an "atrial natriuretic factor" (ANF) brought a fresh new endocrine parameter to the attention of the many basic clinical scientists interested in blood volume, pressure regulation, high blood pressure, and chronic congestive heart failure".

As investigações ulteriores evidenciaram, defato, o significativo papel do peptídeo em inúmeras situações mórbidas, capacitado a favorecer assim, o entendimento de peculiaridades fisiopatológicas de real interesse. No presente trabalho, Caliar e Tafuri expõem de forma lógica, atraente e compreensiva, as etapas sucessivas na descoberta do fenômeno, trazendo aos leitores uma expressiva página da história atual da cardiologia.

Luiz V. Décourt
Coordenador

O Coração Endócrino. A Descoberta do Peptídeo Natriurético Atrial

Marcelo V. Caliar, Washington L. Tafuri
Belo Horizonte, MG

Aristóteles acreditava que a urina era formada na bexiga e que os rins não eram órgãos essenciais. O primeiro a supor uma participação renal na formação de urina foi Galeno, que não só disse que a mesma era formada nos rins, como também era transportada pelos ureteres e armazenada pela bexiga¹.

Em 1662, Bellini descreveu os grandes ductos papilares que levaram o seu nome, mas foi Malpighi, em 1666, que descobriu a verdadeira natureza do córtex renal, o qual continha minúsculos túbulos, enrolados e tortuosos, que se comunicavam com os ductos de Bellini e minúsculos corpúsculos esféricos (corpúsculos de Malpighi) conectados a um destes túbulos. Malpighi interpretou estes corpúsculos como glândulas que secretavam urina, a qual passaria do sistema tubular para a pelve renal, a uretra e a bexiga. Foi Bowman, em 1842, quem descreveu os corpúsculos de Malpighi não como glândulas, mas como unidades constituídas de uma cápsula

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP

Correspondência: Marcelo Vidigal Caliar - UFMG - Instituto de Ciências Biológicas Depto de Patologia Geral - CEP 31270-010 - Belo Horizonte, MG

Recebido para publicação em 22/6/93

Aceito em 16/9/93

sula (cápsula de Bowman) e um tufo capilar no seu interior. Também verificou que, na cápsula, fundiam-se duas arteríolas e um túbulo, sugerindo que qualquer líquido filtrado nos capilares poderia passar do espaço capsular para a luz tubular¹. Ludwig introduziu em 1844 o conceito de ultra-filtração glomerular baseado em forças físicas, no qual um ultrafiltrado destituído de proteínas e elementos figurados do sangue seria formado através da pressão hidrostática fornecida ao sangue pelos batimentos cardíacos¹.

A participação de processos secretórios na formação de urina foi primeiro sugerida por Bowman e, mais tarde, retomada por Heidenhain em 1874; ambos acreditavam que a secreção ocorria nos tufos capilares. Enfim, a reabsorção tubular foi proposta por Cushny em 1917, que afirmou existirem forças de natureza química responsáveis pela reabsorção em diferentes níveis para cada substância¹. Assim, no século XIX, acreditava-se que três processos estavam envolvidos na formação de urina: ultra-filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular. Mas a comprovação da participação de cada um destes processos foi obtida através de evidências acumuladas entre as décadas de 1930 a 1960²⁻⁵.

A constituição da urina, bem como o seu volume, está diretamente relacionada com a regulação do volume e concentração osmolar do líquido extracelular. Tais componentes, por sua vez, estão sob a influência de mecanismos neuro-humorais, receptores de volume, mecanismos efetores renais e osmo-receptores. Assim, a constância dos fluidos corpóreos resulta do importante papel renal de excretor final de água e solutos. Peters relatou pela primeira vez, em 1935, que um aumento no volume sanguíneo circulante provocava uma resposta diurética⁶. A partir de então, tentou-se explicar como essa mudança na função renal poderia ser provocada por um volume sanguíneo alterado.

Foi verificado significativo aumento no volume urinário durante a respiração de ar contendo 5 a 7% de CO₂ e na respiração à pressão negativa^{7,8}. No primeiro caso, a diurese foi atribuída à hiperventilação que levaria a modificações na pressão intratorácica e, no segundo, a um aumento no volume sanguíneo intratorácico. Em ambos os casos, foi proposto que o aumento do volume sanguíneo intratorácico ativaria receptores atriais de volume que, por sua vez, transmitiriam impulsos aferentes através do vago até o hipotálamo, onde haveria inibição da secreção de vasopressina⁹.

Estudando os efeitos da imersão corporal em água, foram observadas diurese e natriurese interpretadas como conseqüentes de uma redistribuição do volume sanguíneo, aumento no volume sanguíneo central, inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da liberação de vasopressina^{10,11}. Na verdade, também na imersão, ocorre o estabelecimento de uma pressão negativa, devido à pressão da água exercida sobre a parede torácica e abdominal¹⁰. DeWardener e col verificaram que

a injeção endovenosa de salina no cão provocava diurese e natriurese e propuseram existir um fator plasmático, chamado de terceiro fator, que seria responsável por esses efeitos^{12, 13}. Alguns autores isolaram do plasma duas frações de aproximadamente 500 e 10.000 daltons, com efeitos diurético e natriurético de ação rápida e longa, respectivamente¹⁴. A fração de baixo peso molecular inibe a atividade da bomba de Na⁺ K⁺ ATPase e, talvez fosse este o mecanismo de indução da natriurese. Esta relação entre o provável fator natriurético e a bomba de Na⁺ K⁺ ATPase tem sido usada como marcador da sua presença¹⁵.

Na tentativa de encontrar o órgão responsável pela síntese do terceiro fator, foram feitos extratos de vários órgãos, como os rins e o coração, os quais foram injetados em animais. Foi observado maior efeito natriurético e diurético com extrato hepático¹⁴, enquanto outros verificaram maior atividade no hipotálamo¹⁶.

Em 1956, Henry e col obtiveram intensa diurese após inflarem um balão de borracha no átrio esquerdo de cães¹⁷. Foi proposto que a distensão atrial levaria à inibição da liberação de vasopressina e à conseqüente diurese. Pela sua grande distensibilidade e pela presença de receptores de volume, os átrios corresponderiam à hipótese formulada por Peters de que haveria algum tipo de mecanismo próximo ao coração que regulasse a quantidade de sangue circulante⁶. Três anos depois, Anderson e col em experimento similar ao de Henry, obtiveram, não somente a diurese mas também uma diminuição da secreção de aldosterona⁸.

Perfundindo rins isolados de cães com sangue obtido de outros cães nos quais foi distendido o átrio esquerdo, foi observada intensa natriurese, sugerindo a presença de alguma substância circulante e responsável pelo efeito natriurético¹⁹.

Em resumo, nos experimentos comentados anteriormente e correlacionados com a tentativa de explicar a natriurese e diurese obtidas através de modificações do volume sanguíneo circulante, pelo menos três fatores poderiam estar envolvidos: um componente neural⁹, uma substância inibidora da bomba de Na⁺ K⁺ ATPase¹⁵ e uma outra correlacionada com o sistema reninaangiotensina-aldosterona^{18,20}.

Além do experimento de Henry, em 1956 aconteceu outro fato marcante: Bruno Kisch descreveu pela primeira vez a presença de pequenos corpos osmiofílicos esféricos, isolados ou aglomerados, no citoplasma de miocardiócitos atriais de cobaia²¹. Foi sugerido que estes corpos seriam originados através de uma condensação de produtos de secreção da célula²². Estudando o sistema de condução cardíaco do rato, Bompiani e col encontraram os corpos osmiofílicos em células do feixe de His e sugeriram uma possível relação entre eles e a condução do estímulo nas células do feixe²³. A injeção de reserpina produziu diminuição do número de corpos osmiofílicos e esta observação levou Palade a pensar que estes corpos

constituíam acúmulos intracelulares de catecolaminas originados do complexo de Golgi²⁴.

A natureza catecolaminérgica dos corpos osmiofílicos foi estudada por muitos autores através do uso de agentes simpaticomiméticos, bloqueadores simpáticos e parassimpáticos e uma variedade de compostos que influenciam o metabolismo das catecolaminas²⁵⁻²⁹. Bloom e col verificaram que os átrios de ciclóstomos possuíam maior quantidade de catecolaminas do que os átrios de mamíferos, proporcionalmente ao número de corpos osmiofílicos presentes nos miocardiócitos atriais²⁵. Em 1964, Jamieson e Palade chamaram os corpos osmiofílicos de grânulos específicos atriais, verificaram que a reação cromafim pare aqueles grânulos era negativa e que os mesmos não incorporavam o precursor imediato da noradrenalina, a dopamina³⁰.

Para Viragh e Porte, os corpos residuais eram precursores dos grânulos específicos atriais³¹, mas os grânulos não continham fosfatase ácida³⁰. Huet e col foram os primeiros a demonstrar que os grânulos específicos atriais eram constituídos por um material de natureza protéica, através da incorporação pelos mesmos de H³ leucina e H³ fucose: também encontraram material eletrondenso marcado no retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi³². A partir do trabalho de Huet e col, foram feitos vários outros estudos, confirmando a natureza protéica dos grânulos específicos atriais³³⁻³³.

Em 1976, Marie e col fizeram a observação histórica de que o número de grânulos específicos atriais do rato variava de acordo com a oferta de água e sódio e com a administração de desoxicorticosterona³⁹. Estes resultados foram confirmados por deBold⁴⁰ e fizeram surgir a hipótese de que os grânulos específicos atriais poderiam estar correlacionados com o mecanismo de sensibilidade atrial, quanto às alterações do volume sanguíneo e com o equilíbrio hídrico e eletrolítico.

Através da injeção endovenosa de extrato atrial de rato em animais da mesma espécie, deBold e col observaram intensa natriurese e diurese. Denominaram a substância responsável por estes efeitos, e ainda não isolada, de fator natriurético atrial (ANF)⁴¹. DeBold decidiu isolar frações de ultracentrifugação dos átrios de rato, ricas em grânulos específicos atriais, e injetar estas frações em ratos, observando intensa natriurese e diurese⁴². Estava comprovada a existência de um hormônio de natureza protéica e desencadeador de natriurese e diurese, no interior dos grânulos específicos atriais. Um ano depois verificou-se que o ANF também provocava efeito relaxante na musculatura lisa⁴³ e esta propriedade seria utilizada como importante marcador na purificação do ANF⁴⁴.

Diferentes grupos de pesquisadores isolaram o ANF através de extratos atriais do homem e de outros animais e realizaram o seu seqüenciamento⁴⁵⁻⁵². Verificaram tratar-se de um grupo de peptídeos que foi denominado de cardionatrina⁴⁷, cardiodilatina⁴⁸, atriopentina⁴⁶,

auriculina⁵⁰ e polipeptídeo/peptídeo natriurético atrial (PNA)⁵¹.

Assim, na década de 1950, ocorreram dois fatos marcantes que levariam à descoberta do ANP: a diurese obtida por Henry e col¹⁷ após inflar um balão de borracha no átrio esquerdo de cães e a descrição dos grânulos específicos atriais por Kisch²¹. Atualmente, está bem estabelecido que uma grande parte dos miocardiócitos atriais e raros ventriculares sintetizam um hormônio peptídico de função natriurética e diurética chamado ANP e o acumulam nos grânulos específicos atriais. Dessa maneira, o órgão que William Harvey acreditava ser o centro mecânico da circulação, com a função de impulsionar o sangue em direção aos vasos sanguíneos⁵³, passava a ser também uma glandula endócrina⁵⁴⁻⁵⁸. Sabe-se hoje que a produção de ANP não se restringe somente aos átrios e, a cada ano, ocorre a descoberta de novos sítios secretores⁵⁹. Através destes achados, iniciou-se uma série de questionamentos relativos a prováveis interações do ANP com outros sistemas, como por exemplo, o imune e o nervoso^{60,61}. Por outro lado, começa a se consolidar a idéia de um novo sistema endócrino, constituído por células produtoras de ANP, situadas principalmente nos átrios e, em menor grau, em vários tecidos espalhados pelo organismo.

Referências

1. Pitts RF - Elementos da Função Renal In Pitts RF, ed: Fisiologia Renal dos Líquidos Corporais. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978: 36-48.
2. Walker AM, Hudson CL - The reabsorption of glucose from the renal tubule in Amphibia and the action of phlorhizin upon it. *Am J Physiol*, 1937;118: 1 30-43.
3. Cross RJ, Taggart JV - Renal tubular transport: Accumulation of p-aminohippurate by rabbit kidney slices. *Am J Physiol*, 1950, 221: 181-90.
4. Taggart JV, Forster RP - Renal tubular transport: Effect of 2,4-dinitrophenol and related compounds on phenol red transport by the isolated tubules of the flounder. *Am J Physiol*, 1950;161 : 167-72.
5. Farah A, Remnick B, Frazer M - The influence of some basic substances on the transport of tetraethylammonium ion. *J Pharmacol Exp Therap*, 1957;119:122-7.
6. Peters JP - Body Water. In: Thomas CC, ed; Springfield, 1935 apud Gauer OH, Henry JP. Circulatory basis of fluid volume control. *Physiol Rev*, 1963; 43: 423-81.
7. Barbour A, Bull GM, Evans BM et al - The effect of breathing 5 to 7% carbon dioxide on urine flow and mineral excretion. *Clin Sci*, 1953;12: 1-13.
8. Gauer OH, Henry JP, Sieker HO et al - The effect of negative pressure breathing on urine flow. *J Clin Invest*, 1954; 33: 287-96.
9. Goetz KL, Wang BC, Geer PG et al - Atrial stretch increases sodium excretion independently of release of atrial peptides. *Am J Physiol*, 1986; 250: R946-50.
10. Epstein M - Cardiovascular and renal effects of head-out water immersion in man. Application of the model in assessment of volume homeostasis. *Circ Res*, 1976; 39: 619-28.
11. Krishna GG, Danovitch GM, Sowers JR - Catecholamine responses to central volume expansion produced by head out water immersion and saline infusion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983; 56: 998-1002.
12. De Wardener HE, Mills IH, Clapham WF et al - Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. *Clin Sci*, 1961; 21: 249-58.
13. DeWardener HE. Natriuretic hormone. *Clin Sci*, 1977; 53: 1-8.
14. Sealey JE, Laragh JH - Further studies of a natriuretic substance occurring in human urine and plasma. *Circ Res*, 1971; 28-29(suppl II): II32-II43.
15. DeWardener HE, Clarkson EM, Bitensky L et al - Effect of sodium intake on ability of human plasma to inhibit renal Na⁺-K⁺-adenosine triphosphatase in vitro. *Lancet*, 1981; 1:411-12.

16. Alagband-Zadeh J, Fenton S, Hancok K et al - Evidence that the hypothalamus may be a source of a circulating Na⁺ K⁺ ATPase inhibitor. *J Endocrinol*, 1983; 98: 221-6.
17. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL - Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res*, 1956; 4: 85-90.
18. Anderson CC, McCally M, Farrel GL - The effects of atrial stretch on aldosterone secretion. *Endocrinology*, 1959; 64: 202-7.
19. Carswell F, Hainsworth R, Ledsome JR - A diuretic response to left atrial distension in the isolated perfused kidney. *J Physiol*, 1968; 195: 20P-21P.
20. Brennan LA, Malvin RL, Jochim KE et al - Influence of right and left atrial receptors on plasma concentrations of ADH and renin. *Am J Physiol*, 1971; 221: 273-8.
21. Kisch B - Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea Pig. *Exp Med Surg*, 1956; 14: 99-112.
22. Farquar MG, Welling SR - Electron microscopic evidence suggesting secretory granular formation within the Golgi apparatus. *J Biophys Biochem Cytol*, 1957; 4: 319-22.
23. Bompiani GD, Rouiller C, Hatt RPY - Le tissu de conduction du coeur chez le rat. Étude au microscope électronique. *Arch Mat Coeur Vaiss*, 1959; 52: 1257-74.
24. Palade GE - Secretory granules in the atrial myocardium. *Anat Rec*. 1961;139: 262.
25. Shore PA, Cohn VH, Highman B et al - Distribution of norepinephrine in the heart. *Nature*, 1958;181: 848-9.
26. Ostlund H, Bloom G, Adams-Ray J et al - Storage and release of catecholamines, and the occurrence of a specific submicroscopic granulation in hearts of cyclostomes. *Nature*, 1960; 188: 324-5.
27. Bloom G, Ostlund E, VonEuler US et al - Studies on catecholamine-containing granules of specific cells in cyclostome hearts. *Acta Physiol Scand*, 1961; 53: 1-34.
28. Okamoto H - An electron microscopic study of the specific granules in the atrial muscle cell upon the administration of agents affecting autonomic nerves. *Arch Histol Jap*, 1969; 30: 467-8.
29. Kuhn H, Richards JG, Tranzler JP - The nature of rat "specific heart granules" with regard to catecholamines: an investigation by ultrastructural cytochemistry. *J Ultrastruct Res*, 1975; 50: 159-66.
30. Jamieson JD, Palade GE - Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol*, 1964; 23: 151-72.
31. Viragh S, Porte A - Le noeud de Keith et Flack et les différents fibres auriculaires du coeur de rat. Étude en microscopie optique et électronique. *C R Acad Sci*, 1960; 251: 2086-8.
32. Huet M, Cantin M - Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. II. Characterization of the protein content of specific granules. *Lab Invest*, 1974; 30: 525-32.
33. Huet M, Benchimol S, Berlinguet JC et al - Cytochimie ultrastructurale des cardiocytes de l'oreillette humaine. IV. Digestion des granules spécifiques par leproteases. *J Microsc*, 1974; 21: 147-58.
34. DeBold AJ, Bencosme SA - Selective light microscopic demonstration of the specific granulation of the rat atrial myocardium by lead-hematoxylin-tartrazine. *Stain Technol*, 1975; 50: 203-5.
35. Berlinguet JC, Huet M, Cantin M - Autotransplantation hétérotropique de l'oreillette chez le rat. Effect sur les granules spécifiques. *Path Biol*, Paris, 1976; 24: 175-82.
36. Cantin M, Timm-Kennedy M, El-Khatib E et al - Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. VI. Comparative study of specific granules in right and left atrial of various animal species. *Anat Rec*. 1979; 193: 55-69.
37. Saetersdal T, Jodalen H, Lie R et al - Effects of isoproterenol on the dense core and perigranular membrane of atrial specific granules. *Cell Tissue Res*, 1979; 199: 213-24.
38. Younge L, Benchimol S, Cantin M - Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. VIII. Radioautographic study of synthesis and migration of proteins. *Cell Tissue Res*, 1980; 207: 1-11.
39. Marie J-P, Guillemot H, Hatt P-Y - Le degré de granulation des cardiocytes auriculaires. Étude planimétrique au cours de différents apports d'eau et de sodium chez le rat. *Path Biol (Paris)*, 1976; 24: 549-54.
40. DeBold AJ - Heart atrial granularity effects of changes in water-electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1979; 161: 508-11.
41. DeBold AJ, Borenstein HB, Veress AT et al - A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, 1981; 28: 89-94.
42. DeBold AJ - Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific granules. *Can J Physiol Pharmacol*, 1981; 60: 324-30.
43. Deth RC, Wong K, Fukuzawa S et al - Inhibition of rat aorta contractile response by natriuresis-inducing extract of rat atrium. *Fed Proc*, 1982; 41: 983.
44. Winquist RJ - Pharmacologic effects of atrial natriuretic peptide. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1987;16: 163-82.
45. DeBold AJ - Atrial natriuretic factor of the rat heart. Studies on isolation and properties. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1982; 170: 133-8.
46. Currie MG, Geller DM, Cole BR et al - Bioactive cardiac substance: Potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science*, 1983; 221: 71-3.
47. Flynn GT, deBold ML, deBold AJ - The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 117: 859-65.
48. Forssmann WG, Hock D, Lottespeich F et al - The right auricle of the heart is an endocrine organ. Cardiodilatin as a peptide hormone candidate. *Anat Embryol*, 1983; 168: 307-13.
49. Gramer RT, Fukumi H, Inagami T et al - Rat atrial natriuretic factor. Purification and vasorelaxant activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 116: 696-703.
50. Atlas SA, Kleinert HD, Camargo MJ et al - Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. *Nature*, 1984; 309: 717-20.
51. Kangawa K, Matsuo H - Purification and complete amino acid sequence of a human atrial natriuretic polypeptide (a-ANP). *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 118: 131-9.
52. Thibault G, Garcia R, Carrier F et al - Structure-activity relationship of atrial natriuretic factor (ANF). I. Natriuretic activity and relaxation of intestinal smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 125: 938-46.
53. Harvey G - Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus. Francofurti: Guilielmi Fitzeri, M. DC. XXVIII (Facsimile et bad. française), Paris: G. Doin, 1950 apud Décourt LV. O mecanismo da circulação do sangue. A verdade pela obra de Harvey. *Arq Bras Cardiol*, 1990; 54: 41-7.
54. DeBold AJ - Atrial natriuretic factor: A hormone produced by the heart. *Science*, 1985; 230: 767-70.
55. Anderson JV, Bloom SR - Atrial natriuretic peptide: What is the excitement all about? *J Endocrinol*, 1986; 64: 7-17.
56. Atlas SA - Atrial natriuretic factor: A new hormone of cardiac origin. *Rec Prog Horm Res*, 1986; 42: 67-77.
57. Cantin M, Genest J - The heart as an endocrine gland. *Sci Am*, 1986; 254: 62-7.
58. Genest J - The atrial natriuretic factor. *Br Heart J*. 1986; 56: 302-16.
59. Vollmar AM - Atrial natriuretic peptide in peripheral organs other than the heart. *Klin Wochenschr*, 1990; 68: 699-708.
60. Debinski W, Kuchel O, Buu NT - Atrial natriuretic factor is a new neuromodulatory peptide. *Neuroscience*, 1990: 15-20.
61. Vollmar AM, Lang RE, Hanze J et al - A possible linkage of atrial natriuretic peptide to the immune system. *Am J Hypertens*, 1990; 3: 408-11.