

Recrutamento Ventricular da Expressão Génica de BNP na Sobrecarga Cardíaca Aguda [57]

ROBERTO RONCON-ALBUQUERQUE JR., TIAGO HENRIQUES-COELHO, CARLA SANTOS-ARAÚJO, ANTÓNIA TELES, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2004;23 (6):871-879

RESUMO

Introdução: O doseamento plasmático do peptídeo natriurético tipo B (BNP) tem assumido uma importância crescente no diagnóstico e na definição do prognóstico da insuficiência cardíaca (IC). Recentemente, foi possível demonstrar que o BNP, a par do seu efeito natriurético, tem ações anti-mitogénicas e antifibróticas no sistema cardiovascular. Em situações fisiológicas este peptídeo é produzido nas aurículas, havendo controvérsia quanto à sua expressão ventricular em corações normais. Neste trabalho, avaliamos, num modelo animal, a expressão ventricular de BNP em condições basais e na sobrecarga cardíaca aguda.

Métodos: Ratos *Wistar* machos (n=18) foram instrumentados com introdução de cateter de pressão no ventrículo direito (VD) para determinação da pressão ventricular, tendo sido submetidos, aleatoriamente, a um de três protocolos: (i) sobrecarga de pressão durante 6 h (SPr; n=6), por *banding* do tronco pulmonar de modo a duplicar a pressão sistólica basal do ventrículo direito (VD); (ii) sobrecarga de volume com perfusão de dextrano40 durante 6 h (SVol; n=6) de modo a quadruplicar a pressão telediastólica VD basal; (iii) grupo *sham* (n=6). No final do protocolo experimental foram colhidas amostras transmuralis da parede livre do VD para quantificação do ARNm (RT e *real-time* PCR quantitativo) do BNP. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão (número moléculas ARNm de interesse) / (ng ARNm total); P < 0,05.

Resultados: No grupo *sham* verifica-se uma expressão basal de BNP de

ABSTRACT

Ventricular BNP Gene Expression in Acute Cardiac Overload

Introduction: B-type natriuretic peptide (BNP) plasma levels have important diagnostic and prognostic implications in heart failure (HF). Recently, aside from its natriuretic effect, antiproliferative and antifibrotic actions of BNP on the cardiovascular system have been described. Under physiological conditions the atria are the main source of this peptide, while its ventricular expression is still controversial. The aim of this work was to evaluate, in an animal model, the ventricular expression of BNP in normal hearts, at baseline and under acute cardiac overload.

Methods: Anesthetized open chest male *Wistar* rats (n=18) were instrumented with a micromanometer in the right ventricular cavity for pressure assessment. Randomization for three different protocols was then performed: (i) pressure overload for a period of 6 hours (SPr; n=6), by pulmonary trunk banding, in order to double basal right ventricular systolic pressure; (ii) volume overload with a six-hour perfusion of Dextran 40 (SVol; n=6), to raise end-diastolic right ventricular pressure fourfold; (iii) sham operated rats (n=6). Transmural samples from the right ventricular free wall were then obtained for quantification of BNP mRNA by RT and quantitative real-time PCR. The results are expressed as mean \pm SEM (number molecules of mRNA BNP) / (ng total mRNA); p < 0.05.

Results: A basal expression of BNP was identified in the sham group

$3,6 \cdot 10^7 \pm 1,7 \cdot 10^7$. Nos grupos SPr e SVol os níveis de ARNm do BNP são superiores aos do grupo *sham* ($+123,1 \pm 46,3\%$ na SPr e $+171,6 \pm 87,7\%$ na SVol).

Conclusões: A sobrecarga ventricular aguda de pressão e de volume acompanha-se de um recrutamento ventricular da expressão de BNP. Estes resultados sugerem que o BNP poderá participar na remodelagem ventricular precoce em condições de sobrecarga cardíaca.

Palavras-Chave

ARNm; Coração; Peptídeo natriurético tipo B; Sobrecarga aguda

$(3,6 \cdot 10^7 \pm 1,7 \cdot 10^7)$. BNP mRNA levels were elevated in both the SPr and SVol groups ($+123,1 \pm 46,3\%$ SPr and $+171,6 \pm 87,7\%$ SVol).

Conclusions: Acute cardiac pressure and volume overload are associated with increased ventricular BNP gene expression. Our results suggest that BNP may be involved in early ventricular remodeling.

Key words

mRNA; Heart; Natriuretic peptide type B; Cardiac overload

INTRODUÇÃO

A actividade neuro-endócrina do coração está hoje claramente demonstrada, sendo-lhe atribuída a produção de várias moléculas com acção endócrina, parácrina e autócrina. Uma das primeiras a ser identificada, há mais de 20 anos, foi o então designado Peptídeo Natriurético Auricular⁽¹⁾.

Até ao momento actual, foram purificados e sequenciados quatro polipeptídeos pertencentes à família dos Peptídeos Natriuréticos: Peptídeo Natriurético Auricular (ANP), Tipo B (BNP), Tipo C (CNP) e Tipo D (DNP). Destes, apenas ao ANP e BNP foi atribuída secreção cardíaca fisiologicamente importante⁽²⁾.

No coração adulto, as aurículas são o principal local de expressão do ARNm do ANP, sendo os valores ventriculares apenas 0,5-3,0% dos observados nas aurículas⁽³⁾. O BNP, originalmente identificado em extractos cerebrais porcinos, está igualmente presente no cérebro humano. Múltiplos estudos levados a cabo em modelos animais de insuficiência cardíaca (IC) e no miocárdio humano insuficiente demonstraram que, nestes casos, o miocárdio ventricular é o principal local de expressão de BNP⁽³⁾.

Estas moléculas, que são principalmente conhecidas pelas suas propriedades diuréticas, natriuréticas e vasodilatadoras, desempenham também um importante papel como factores antiproliferativos, neuromediadores do sistema nervoso central e reguladores parácrinos do crescimento ósseo⁽⁴⁾. Está também descrito o seu efeito como hormonas contra-regula-

INTRODUCTION

The neuroendocrine activity of the heart has been clearly demonstrated and the production of various molecules with endocrine, paracrine and autocrine effect has been attributed to such processes. One of the first of these to be identified, over 20 years ago, was designated atrial natriuretic peptide⁽¹⁾.

To date four polypeptides belonging to the family of natriuretic peptides have been purified and sequenced: atrial natriuretic peptide (ANP), B-type (BPN), C-type (CNP) and D-type (DPN); of these four, physiologically important cardiac secretion has been attributed only to ANP and BNP⁽²⁾.

In the adult heart, the principal location for ANP mRNA expression is in the atria; ventricular values are only 0.5-3% of those observed in the atria⁽³⁾. BNP, which was originally identified in extracts of pig brain, is also present in the human brain. Numerous studies on animal heart failure (HF) models and on failing human myocardium have shown that in such cases the ventricular myocardium is the principal location of BNP expression⁽³⁾.

These molecules, which are mainly known for their diuretic, natriuretic and vasodilatory properties, have additional important roles as antiproliferative factors, neuromediators of the central nervous system and paracrine regulators of bone growth⁽⁴⁾. Their effects as counter-regulatory hormones in vascular remodeling, in which they play a central role in the pathophysiology of hypertension and arteriosclerosis, have also been described⁽⁵⁾.

doras no processo de remodelagem vascular, onde desempenham um papel central na fisiopatologia da hipertensão arterial e da aterosclerose⁽⁵⁾.

A evidência de que ratinhos *knock-out* para o receptor tipo A dos peptídeos natriuréticos (NPR-A; o principal receptor efetor para o ANP e BNP) apresentam um aumento da hipertrofia cardíaca em resposta à hipertensão arterial e de que o aumento da expressão miocárdica de NPR-A por transferência gênica induz uma diminuição no tamanho dos cardiomiócitos sugere que o sistema dos peptídeos natriuréticos participa na contra-regulação da remodelagem ventricular⁽⁶⁾.

Alguns estudos demonstram que, no coração fetal, a contribuição ventricular para a secreção de ANP e BNP é superior à do adulto e diminui com o desenvolvimento gestacional⁽⁷⁾. Na hipertrofia cardíaca verifica-se a reativação do programa gênico fetal, onde se incluem os genes que codificam o ANP e o BNP⁽⁸⁾. Consequentemente, o aumento da expressão gênica de BNP no miocárdio ventricular adulto é frequentemente utilizado como marcador da indução do programa gênico fetal na progressão para a IC.

Estudos experimentais e clínicos revelaram que os níveis plasmáticos de BNP se correlacionam com o grau de disfunção sistólica e diastólica e com o grau de hipertrofia ventricular em doentes com patologia cardíaca, aumentando na proporção da gravidade da IC⁽⁹⁾.

O valor prognóstico dos níveis plasmáticos de BNP em doentes com IC em diferentes fases de evolução da doença é superior ao dos outros peptídeos natriuréticos e índices de ativação neuro-humoral. Adicionalmente, verificou-se que as variações nos níveis plasmáticos do BNP induzidas pela intervenção farmacológica na IC têm implicações no prognóstico destes doentes. O reconhecimento da importância do BNP no diagnóstico, gravidade e prognóstico da IC crônica constituiu um marco na abordagem clínica desta doença⁽⁹⁾. No entanto, a importância da expressão ventricular de BNP na sobrecarga cardíaca aguda permanece ainda por estabelecer, pela escassez de estudos experimentais e clínicos.

Neste contexto, foram objetivos do presente trabalho avaliar, num modelo animal, a expressão gênica de BNP no miocárdio ventricular em condições basais e na sobrecarga cardíaca aguda.

There is evidence that knock-out mice deficient in the A-type natriuretic peptide receptor (NPR-A, the principal effector-receptor for both ANP and BNP), display an increase in cardiac hypertrophy in response to arterial hypertension and that an increase in myocardial expression of NPR-A by introduction of the NPR-A transgene induces a reduction in cardiac myocyte size. These findings would suggest that the natriuretic peptide system plays a part in the counterregulation of ventricular remodeling⁽⁶⁾.

Some studies show that, in the fetal heart, the ventricular contribution in ANP and BNP secretion is higher than in adults and that it diminishes during gestational development⁽⁷⁾. In myocardial hypertrophy, a reactivation of the fetal gene program has been noted, including the genes that code for ANP and BNP⁽⁸⁾. Consequently, an increase in BNP gene expression in the adult ventricular myocardium is frequently used as a marker of the induction of the fetal gene program in the progression to HF.

Experimental and clinical studies have shown that plasma BNP levels correlate with the degree of systolic and diastolic dysfunction as well as of ventricular hypertrophy in patients with heart disease, and increase in proportion to the severity of HF⁽⁹⁾.

The prognostic value of plasma BNP levels in HF patients at different stages of the development of the disease is greater than that of other natriuretic peptides or of neurohumoral activation indices. Additionally, it has been shown that variations in plasma BNP levels induced by pharmacological intervention in HF have implications in the prognosis of these patients. Recognition of the importance of BNP in the diagnosis, severity and prognosis of chronic HF has been an important step in the clinical approach to this disease⁽⁹⁾. On the other hand, the importance of ventricular BNP expression in acute cardiac overload has still to be established, as there is a scarcity of clinical and experimental studies.

In this context, the aim of this work is to evaluate, in an animal model, the ventricular expression of BNP in normal hearts at baseline and under acute cardiac overload.

METHODS

This work is in accordance with European Directive 86/609, adopted into national law in

MÉTODOS

Este trabalho respeita a Directiva Europeia 86/609, transposta para o direito nacional pelo D.-L. 129/92 de 6 de Junho e Portaria 1005/92 de 23 de Outubro e está de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (NIH Publication No. 85-23, revisto em 1996).

Preparação experimental

Ratos *Wistar* macho ($n=18$; 202 ± 34 g) foram anestesiados com pentobarbital (6 mg/100 g, ip) e colocados sobre uma placa aquecida para manter a temperatura corporal entre 36-38°C, após o que foram monitorizados com ECG contínuo (DII) para controlo da frequência cardíaca (*Datascope* 2000A). Para compensar as perdas de líquidos que ocorrem perioperatoriamente, procedeu-se à cateterização de uma veia jugular e iniciou-se uma perfusão contínua de soro fisiológico (0,9% de NaCl), com 40 mEq/L de KCl e 80 mEq/L de NaHCO₃. Os animais foram, depois, traqueostomizados e ventilados mecanicamente (*Harvard Small Animal Ventilator, Model 683*) com ar enriquecido em oxigénio. De seguida, efectuou-se uma esternotomia mediana, abriu-se completamente o pericárdio e dissecou-se o tronco pulmonar. O tronco pulmonar foi ligado com uma seda 4 para permitir a constrição do vaso durante um dos protocolos experimentais (*vide infra*). Finalmente, procedeu-se à instrumentação cardíaca para o registo das pressões do ventrículo direito (VD) através de um micromanómetro 2F de alta-fidelidade (*SPR-324 Millar Instruments*) inserido na parede livre do VD.

Protocolo experimental

Após a instrumentação (~30 minutos), a preparação animal estabilizou durante ~15 minutos. Os animais foram então submetidos, aleatoriamente, a um de três protocolos: (i) sobrecarga de pressão durante 6h (SPr; $n=6$), por *banding* do tronco pulmonar de modo a duplicar a pressão sistólica basal do VD; (ii) sobrecarga de volume com perfusão de dextrano40 durante 6 h (SVol; $n=6$) de modo a quadruplicar a pressão tele-diastólica VD basal; (iii) grupo *sham* ($n=6$).

No final dos protocolos experimentais foram colhidas e armazenadas (-70°C) amostras transmuralis da parede livre do VD para quantificação do ARNm do BNP no miocárdio ventricular.

Decree-Law 129/92 of 6 June 1992 and Order in Council 1005/92 of 23 October 1992, and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes for Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996).

Experimental Preparation

Male *Wistar* rats ($n=18$; 202 ± 34 g) were anesthetized with pentobarbital (6 mg/100 g body weight i.p.) and placed on a heated tray to maintain body temperature between 36 and 38°C, and then monitored with continuous ECG (*Doppler II*) to monitor heart rate (*Datascope* 2000A). To compensate for perioperative liquid loss, catheterization of the jugular vein was carried out and continuous perfusion of saline solution (0.9% NaCl) was initiated, with 40 mEq/L of KCl and 80 mEq/L NaHCO₃. The animals were later tracheostomized and ventilated mechanically (*Harvard Small Animal Ventilator, Model 683*) with oxygen-rich air. Next a median sternotomy was carried out, the pericardium was opened out completely and the pulmonary trunk dissected and bound with 4 silk so as to permit constriction of the vessel during one of the experimental protocols (see below). Finally, cardiac instruments were fitted to record right ventricular (RV) pressure by means of a 2F high-fidelity micromanometer-tipped catheter (*Miller Instruments SPR-324*) inserted into the free wall of the RV.

Experimental Protocol

After the instrumentation phase (~30 minutes), the prepared animals were stabilized for about 15 minutes. They were then randomized to one of three protocols: (i) pressure overload for a period of 6 hours (SPr; $n=6$), by pulmonary trunk banding, in order to double basal right ventricular systolic pressure; (ii) volume overload with a six-hour perfusion of Dextran 40 (SVol; $n=6$), to increase end-diastolic right ventricular pressure fourfold; (iii) sham operated rats ($n=6$).

On completion of the experimental protocols, transmural samples from the right ventricular free wall were then taken and stored at -70°C for quantification of BNP mRNA in the ventricular myocardium.

Recording and analysis of hemodynamic data

All data were acquired during suspended respiration at end-expiration. Digital conver-

Registo e análise dos dados hemodinâmicos

As aquisições foram efectuadas com a respiração suspensa no final da expiração. A conversão digital dos dados foi efectuada a uma frequência de 1000 Hz. Foram posteriormente determinados e analisados os seguintes parâmetros de função do VD: pressão telediastólica VD (PVD_{TD}; mmHg); pressão sistólica máxima VD (PVD_{max}; mmHg); velocidades máximas de subida e de queda da pressão VD (VD-dP/dt_{max} e VD-dP/dt_{min}, respectivamente; mmHg/s); frequência cardíaca.

Quantificação do ARNm

A extracção do ARNm total das amostras transmuralis da parede livre do VD foi efectuada após homogeneização com um pilão metálico (rotor ~800 rpm), pelo método de guanídio-tiocianato e ligação a membrana de sílica-gel, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen 74124). A pureza da amostra (avaliada pela razão das absorvâncias a 260 e 280 nm) e a quantidade total de ARNm (1 A₂₆₀= 40.0 µg/ml) foi determinada por espectrofotometria (Eppendorf 6131 000.012).

Síntese do padrão homólogo de ARN do BNP: A síntese do ADNc total foi obtida por transcrição reversa (10 minutos a 22 °C, 50 minutos a 50 °C e 10 min a 95 °C; volume total: 20 µl): transcriptase reversa 40 U (Invitrogen 18064-014); inibidor das ribonucleases 20 U; sondas aleatórias 0,6 µg; mistura de nucleótidos 0,5 mM; MgCl₂ 1,9 mM; DTT 10 mM. O ADNc de interesse foi então amplificado por *polymerase chain reaction* (PCR; 35 ciclos, temperatura de *annealing* 60 °C; volume total: 50 µl), utilizando sondas *forward*-padrão e *reverse* específicas para o BNP (*fw*: 5'-GGA CCA AGG CCC TAC AAA AGA-3' e *rev*: 5'-CAG AGC TGG GGA AAG AAG AG-3'): polimerase *Taq* 1,25 U (Promega M1865); mistura de nucleótidos 0,4 mM; MgCl₂ 2,0 mM; sondas *forward*-padrão e *reverse* 0,4 mM. O padrão de ADNc do BNP foi depois separado por electroforese num gel de agarose a 2% (brometo de etídeo 0,5 µg/ml) e extraído, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen 28704). A transcrição *in vitro* foi então efectuada a partir de 400 ng de ADNc padrão do BNP sob o controlo do promotor da polimerase de ARN do fago T3 (Epicentre AS 2603). Para confirmar a integridade do ARN padrão, 10% do produto da transcrição *in vitro* foi separado por electro-

sion was at 1000 Hz. The following RV function parameters were later determined and analyzed: right ventricular end-diastolic pressure (RVPTD; mmHg); maximum RV systolic pressure (RVP_{max}; mmHg); maximum velocity of RV pressure rise and fall (RV-dP/dt_{max} and RV-dP/dt_{min} respectively; mmHg); and heart rate.

Quantification of mRNA

After homogenization with a metallic centrifuge (rotor ~800 rpm), extraction of the total mRNA from the transmural samples of the right ventricular free wall was carried out using the guanidine-thiocyanate method and loaded onto a silica gel membrane in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen 74124). Sample purity (based on the ratio of UV absorptions at 260 nm and 280 nm) and the total quantity of mRNA (1 A₂₆₀= 40.0 µg/ml) was determined spectrophotometrically (Eppendorf 6131 000.012).

Synthesis of the standard homologue of BNP RNA: cDNA synthesis was achieved by reverse transcription (10 minutes at 22 °C, 50 minutes at 50 °C and 10 minutes at 95 °C; total volume: 20 µL): reverse transcriptase 40 U (Invitrogen 18064-014); ribonuclease inhibitor 20 U; random primers 0.6 µg; nucleotide mixture 0.5 mM; MgCl₂ 1.9 mM and DTT 10 mM. The required cDNA was then amplified by the polymerase chain reaction (PCR) (35 cycles, annealing temperature 60 °C; total volume 50 µL), using standard forward and reverse primers specific for BNP (forward: 5'-GGA CCA AGG CCC TAC AAA AGA-3' and reverse: 5'-CAG AGC TGG GGA AAG AAG AG-3'): *Taq* polymerase 1.25 U (Promega M1865); nucleotide mixture 0.4 mM; MgCl₂ 2.0 and standard forward and reverse primers 0.4 mM. The standard BNP cDNA was then separated by electrophoresis in a 2% agarose gel (ethidium bromide 0.5 µg/ml) and extracted in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen 28704). *In vitro* transcription was then carried out using 400 ng of standard BNP cDNA under the control of a T3 phage RNA polymerase promoter (Epicentre AS 2603). To confirm the integrity of the standard RNA, 10% of the *in vitro* transcription product was separated by electrophoresis on a 1% agarose gel. The purity of the sample and the RNA concentration were determined by spectrophotometry (see above).

Absolute quantification of BNP mRNA by real-time RT-PCR: After reverse transcription,

forese num gel de agarose a 1%. A pureza da amostra e a concentração de ARN foram determinadas por espectrofotometria (*vide supra*).

Quantificação absoluta do ARNm do BNP por real-time RT-PCR: Após a transcrição reversa (*vide supra*), em duplicado, de 50 ng de ARNm total de cada amostra, efectuou-se a amplificação do ADNc do BNP por *real-time* PCR (*Corbett-Research Rotor-Gene 2000*) com sondas *forward* e *reverse* específicas para o BNP (*vide supra*), utilizando como marcador fluorescente o *SYBR Green* (*Qiagen 204143*). A quantificação absoluta do ARNm do BNP foi efectuada utilizando uma curva-padrão construída a partir de diluições sucessivas do ARNc padrão do BNP ($r=0,994$): 1×10^{10} , 5×10^9 , 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 e 5×10^7 moléculas/ μ L.

Análise estatística: Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão. Nos dados hemodinâmicos, são apresentadas as médias das percentagens de variação em relação ao valor basal ($\Delta\%$ basal) para todos os parâmetros hemodinâmicos excepto para PVD_{TD} , onde são apresentados como variação do basal (Δ basal). As variáveis analisadas foram comparadas pelo teste *one-way* ANOVA. Quando as diferenças foram estatisticamente significativas utilizou-se o teste *StudentNewmanKeuls* para efectuar comparações múltiplas emparelhadas. A comparação dos níveis de ARNm do BNP nos grupos SPr, SVol e Sham foi efectuada pelo teste *one-way* ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros Hemodinâmicos

Os dados hemodinâmicos são apresentados na *Fig. 1*.

No grupo *Sham*, todos os parâmetros analisados permaneceram estáveis durante o protocolo experimental. No início da instrumentação e após o período de estabilização, não se verificaram diferenças significativas entre os três grupos para cada um dos quatro parâmetros hemodinâmicos considerados (PVD_{max} , $VD-dP/dt_{max}$, $VD-dP/dt_{min}$ e PVD_{TD}).

No grupo SVol, verificou-se um aumento progressivo da PVD_{TD} (Δ basal = $5,8 \pm 1,27$ mmHg), significativamente maior que o observado nos grupos *Sham* e SPr, enquanto a PVD_{max} aumentou durante o protocolo experi-

in duplicate (see above), 50 ng of total mRNA was taken from each sample and the BNP cDNA was amplified by real-time PCR (*Corbett-Research Rotor-Gene 2000*) with BNP-specific forward and reverse primers (see above), using SYBR Green (*Qiagen 204143*) as a fluorescent marker. Absolute quantification of BNP mRNA was carried out using a standard curve created from successive dilutions of standard BNP cDNA ($r=0,994$): 1×10^{10} , 5×10^9 , 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 and 5×10^7 molecules/ μ L.

Statistical analysis: Results are given as means \pm SEM. Hemodynamic data are presented as the mean percentage variation in relation to the basal value (basal $\Delta\%$) for all hemodynamic parameters except $RVPTD$, where they are presented as basal variation (basal Δ). The variables analyzed were compared using the ANOVA one-way test. When differences were statistically significant, the Student-Newman-Keuls test was employed to carry out multiple paired comparisons. BNP mRNA levels in the three groups, SPr, SVol and Sham, were compared with the ANOVA one-way test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Hemodynamic parameters

The hemodynamic data is shown in *Fig. 1*.

In the Sham group, all parameters analyzed remained stable during the experimental protocol. At the beginning of the instrumentation, and after the stabilization period, no significant differences were observed between the three groups for any of the four hemodynamic parameters under consideration (RVP_{max} , $RV-dP/dt_{max}$, $RV-dP/dt_{min}$ and RVP_{TD}).

In the SVol group, a progressive increase in RVP_{TD} was noted (Δ basal = 5.8 ± 1.27 mmHg), significantly greater than was observed in the SPr or Sham groups, while RVP_{max} increased during the experimental protocol in a statistically significant manner. On the other hand, $RV-dP/dt_{max}$ and $RV-dP/dt_{min}$ did not vary significantly during the protocol.

In the SPr group, an increase in RVP_{max} and $RV-dP/dt_{max}$ was observed (basal $\Delta\%$ = $85.2 \pm 3.8\%$). $RV-dP/dt_{min}$ and $RVPTD$ did not show significant variation during the 6 hours of the experimental protocol.

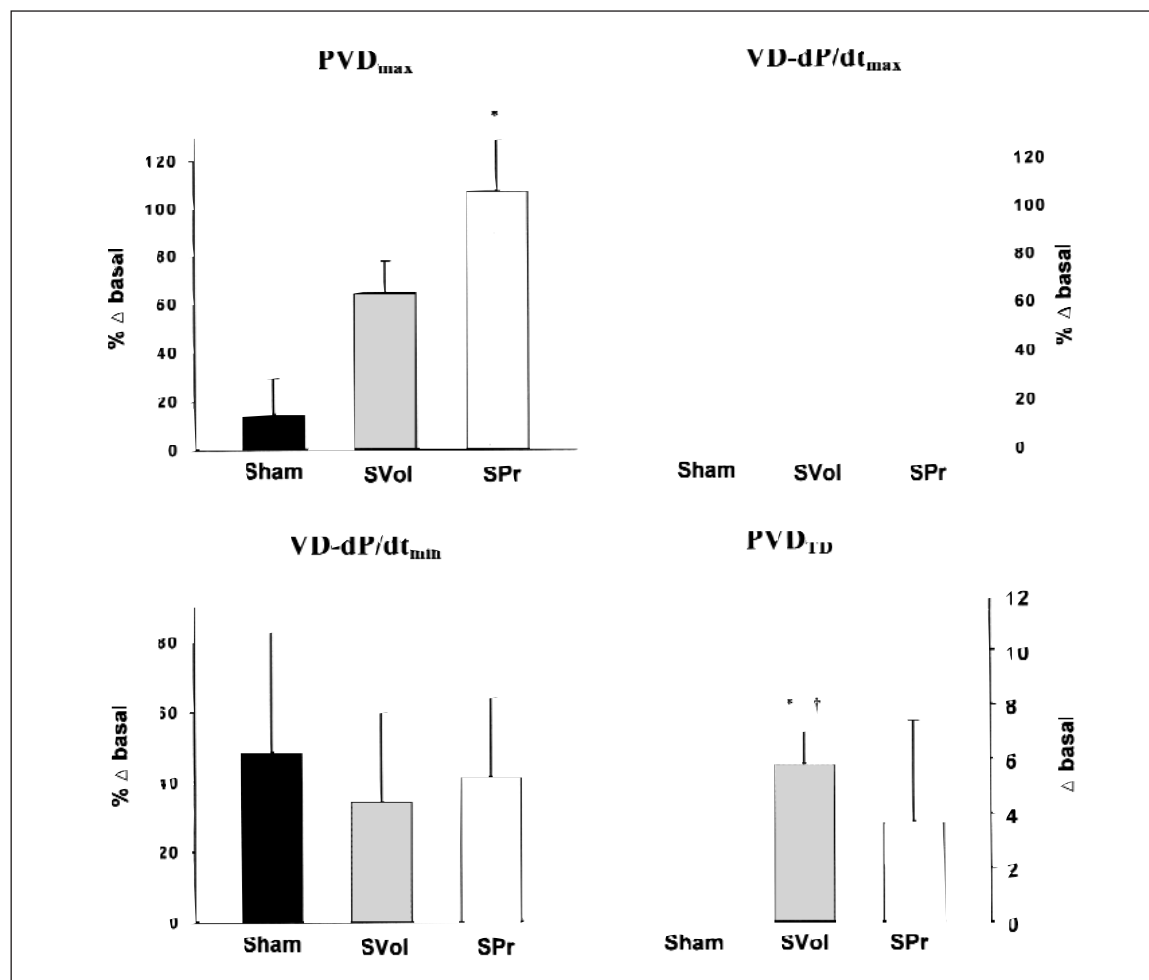


Fig. 1 Resultados hemodinâmicos (expressos em variação de % do valor basal para a PVD_{max} , $VD-dP/dt_{max}$, $VD-dP/dt_{min}$ e em Δ basal para PVD_{TD}), obtidos por instrumentação cardíaca para o registro das pressões do VD por inserção de um micromanómetro, dos três grupos experimentais: Sham; SPr, submetido a sobrecarga aguda de pressão por banding do tronco pulmonar e SVol, a quem foi imposta sobrecarga de volume por infusão de 6 horas de solução de Dextrano40. Após o período de estabilização inicial, e antes da manipulação experimental, não se verificaram diferenças significativas entre os três grupos para cada um dos quatro parâmetros hemodinâmicos considerados. No grupo SVol verificou-se um aumento estatisticamente significativo da PVD_{max} em relação ao grupo Sham; a PVD_{TD} foi significativamente superior à apresentada no final do protocolo experimental pelos grupos Sham e SPr. A $VD-dP/dt_{max}$ e $VD-dP/dt_{min}$ não variaram significativamente. No grupo SPr verificou-se um aumento da $VD-dP/dt_{max}$, $VD-dP/dt_{min}$ e PVD_{TD} . $VD-dP/dt_{min}$ não variou significativamente durante as 6 h do protocolo experimental; * $p < .05$ vs Sham e † $p < .05$ vs SPr.

Fig. 1 Hemodynamic results (expressed as variation of % basal value for RVP_{max} , $RV-dP/dt_{max}$, $RV-dP/dt_{min}$ and as Δ basal for RVP_{TD}), obtained by cardiac instrumentation (insertion of micromanometer) to record RV pressures in each of the three experimental groups: Sham; SPr, with acute pressure overload imposed by pulmonary trunk banding; and SVol, with volume overload imposed by infusion for 6 hours with Dextran 40. Before beginning the experimental protocol, and after the initial stabilization period, no significant differences were observed between the three groups for any of the four hemodynamic parameters under consideration. In the SVol group a statistically significant increase in RVP_{max} was observed compared to the Sham group and RVP_{TD} was significantly higher than the final values presented by the Sham and SPr groups, while the $RV-dP/dt_{max}$ and $RV-dP/dt_{min}$ values did not vary significantly. In the SPr group, an increase in RVP_{max} and $RV-dP/dt_{max}$ was observed while $RV-dP/dt_{min}$ and RVP_{TD} did not show significant variation during the 6 hours of the experimental protocol. * $p < 0.05$ vs. Sham and † $p < 0.05$ vs. SPr.

mental de forma estatisticamente significativa. Durante o protocolo experimental $VD-dP/dt_{max}$ e $VD-dP/dt_{min}$ não variaram significativamente.

No grupo SPr, verificou-se um aumento da PVD_{max} e $VD-dP/dt_{max}$ (Δ % basal = $85,2 \pm 3,8$ %). $VD-dP/dt_{min}$ e PVD_{TD} não variaram significativamente durante as 6 h do protocolo experimental.

Gene expression of BNP in the ventricular myocardium

In the Sham group, a basal expression of $3.6 \cdot 10^7 \pm 1.7 \cdot 10^7$ molecules/(ng of total mRNA) of BNP was identified in the ventricular myocardium. BNP mRNA levels were elevated in both the SPr and SVol groups compared to the Sham group [$8.1 \cdot 10^7 \pm 1.7 \cdot 10^7$ SPr and

Expressão Génica de BNP no Miocárdio Ventricular

No grupo *Sham* verificou-se, no miocárdio ventricular, uma expressão basal de BNP de $3,6 \cdot 10^7 \pm 1,7 \cdot 10^7$ moléculas / (ng de ARNm total). Nos grupos *SPr* e *SVol* verificou-se que os níveis de ARNm do BNP foram superiores aos do grupo *Sham* [$8,1 \cdot 10^7 \pm 1,7 \cdot 10^7$ *SPr* e $9,8 \cdot 10^7 \pm 2,1 \cdot 10^7$ *SVol*; moléculas / (ng ARNm total)]. Os níveis de ARNm entre os grupos *SPr* e *SVol* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO

A sobrecarga cardíaca conduz à hipertrofia dos cardiomiócitos com aumento da produção de matriz extracelular pelos fibroblastos cardíacos, sendo que esta remodelagem do interstício cardíaco é um determinante importante da hipertrofia patológica, conduzindo à disfunção ventricular e IC⁽¹⁰⁾. O papel desempenhado pelos peptídeos natriuréticos, nomeadamente pelo BNP, como factores antifibróticos ventriculares derivados do cardiomiócito em circunstâncias de sobrecarga crónica começa a ficar definido⁽¹¹⁾. A modulação negativa exercida por estes factores a nível dos genes envolvidos na deposição de matriz extracelular cardíaca ou vascular, ou o papel regulador na remodelagem vascular através da produção de substâncias vasodilatadoras constituem possíveis vias contrarreguladoras do processo fibrótico irreversível que se estabelece em resposta a um estímulo de sobrecarga prolongada. A modulação desta resposta em situações de sobrecarga aguda permanece, ainda, por esclarecer.

Até ao momento, o papel da síntese ventricular de BNP pelo coração adulto em condições basais tem sido considerado pouco relevante do ponto de vista fisiológico⁽⁴⁾. Neste trabalho constatou-se uma expressão basal de BNP no miocárdio ventricular normal de rato.

A sobrecarga imposta ao miocárdio ventricular durante o período de 6 horas traduziu-se hemodinamicamente numa elevação da pressão máxima do VD na sobrecarga de pressão e num aumento da pressão telediastólica do VD na sobrecarga de volume. Estas alterações induzidas pela sobrecarga aguda acompanharam-se de um recrutamento ventricular da expressão génica de BNP, tanto na sobrecarga aguda de pressão como na de volume.

Em conclusão, a sobrecarga ventricular aguda de pressão e de volume acompanha-se

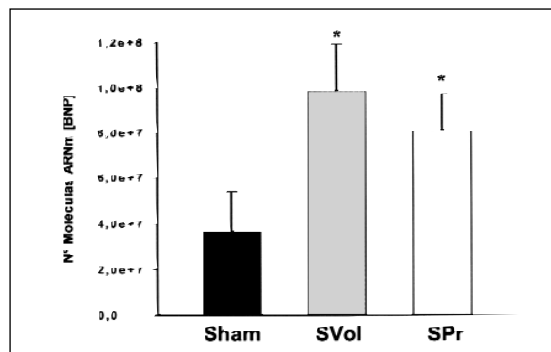


Fig. 2 Quantificação de ARNm, por real-time RT-PCR quantitativo, do BNP do ventrículo direito dos três grupos experimentais: Sham; *SPr*, submetido a sobrecarga aguda de pressão por banding do tronco pulmonar e *SVol*, a quem foi imposta sobrecarga de volume por infusão de 6 horas de solução de Dextrano40. Nos dois grupos submetidos a elevação aguda da carga cardíaca (pressão e volume) verificou-se um aumento do número de moléculas de ARNm do BNP.

Fig. 2 Quantification of right ventricular BNP mRNA using quantitative real-time RT-PCR in the three experimental groups: Sham; *SPr*, with acute pressure overload imposed by pulmonary trunk banding; and *SVol*, with volume overload imposed by infusion for 6 hours with Dextran 40. An increase in the number of BNP mRNA molecules was detected in both the groups that underwent acute cardiac overload (pressure and volume).

$9,8 \cdot 10^7 \pm 2,1 \cdot 10^7$ *SVol*; molecules/(ng of total mRNA)]. There were no statistically significant differences in mRNA levels between the *SPr* and *SVol* groups.

DISCUSSION

Cardiac overload leads to hypertrophy of cardiomyocytes with increased production of extracellular matrix by cardiac fibroblasts, and this remodeling of the cardiac interstices is an important determinant of pathological hypertrophy, leading to ventricular dysfunction and HF⁽¹⁰⁾. There is increasing agreement concerning the role of the natriuretic peptides, and BNP in particular, as cardiomyocyte-derived ventricular antifibrotic factors in circumstances of chronic overload⁽¹¹⁾. It is possible that both the negative modeling exercised by these factors at the level of the genes involved in the deposition of the cardiac or vascular extracellular matrix, and the regulatory role in vascular remodeling through production of vasodilators, could constitute counterregulatory pathways in the irreversible fibrotic process which takes place in response to the stimulus of prolonged overload. The modulation of this response in situations of acute overload has yet to be clarified.

To date, the role played by ventricular synthesis of BNP in the adult heart in basal

de um recrutamento ventricular da expressão de BNP. Estes resultados sugerem que o sistema dos peptídeos natriuréticos poderá participar na remodelagem ventricular precoce em condições de sobrecarga cardíaca.

Pedido de separatas para:
Address for reprints:

ADELINO F. LEITE-MOREIRA
Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
4200-319 PORTO, PORTUGAL
E-mail: amoreira@med.up.pt

conditions has been considered of little importance from a physiological point of view⁽⁴⁾. In this work basal BNP expression was found in normal rat ventricular myocardium.

Overload applied to the ventricular myocardium over a period of 6 hours brought about a rise in maximum RV pressure in the case of pressure overload, and a rise in end-diastolic RV pressure for volume overload. The alterations induced by acute overload were found to be accompanied by a ventricular recruitment of BNP gene expression, for both acute pressure and volume overload.

In conclusion, acute ventricular pressure and volume overload are associated with increased ventricular BNP gene expression. These results suggest that the natriuretic peptide system may be involved in early ventricular remodeling in response to cardiac overload.

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94.
2. Levin ER, Gardiner DC, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339:321-8.
3. Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992;44:479-602.
4. Cameron VA, Ellmers L. Minireview: Natriuretic peptides during development of fetal heart and circulation. *Endocrinology* 2003;144:2191-4.
5. Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990;86:1690-7.
6. Kishimoto I, Rossi K, Garbers D. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2703-6.
7. Takahashi T, Allen PD, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. *Circ Res* 1992;71:9-17.
8. Calderone A, Takahashi N, Izzo Jr N, Thaik C, Colucci W. Pressure and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 1995;92:2385-90.
9. Bettencourt P, Friões F, Azevedo A, Dias P, Pimenta J, Rocha-Goncalves F, Ferreira A. Prognostic information provided by serial measurements of brain natriuretic peptide in heart failure. *Int J Cardiol* 2004;93:45-8.
10. Tsutomoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, et al. Attenuation of compensation of endogenous cardiac peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1997;96:509-16.
11. Ellmers LJ, Knowles JW, Kim HS, Smithies O, Maeda N, Cameron VA. Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1(-/-) mice with cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H707-14.