

AÇÃO AUTÓCRINA DA OCITOCINA EM CARDIOMIÓCITOS: DUPLA ESTIMULAÇÃO DA SECREÇÃO DE ANP E INIBIÇÃO DEPENDENTE DE ÓXIDO NÍTRICO

AUTOCRINE OXYTOCIN ACTION IN CARDIOMYOCYTES: DUAL STIMULATION OF ANP SECRETION AND NITRIC OXIDE-DEPENDENT INHIBITION

ACCIÓN AUTOCRINA DE LA OXITOCINA EN CARDIOMIOCITOS: ESTIMULACIÓN DUAL DE LA SECRECIÓN DE ANP E INHIBICIÓN DEPENDIENTE DEL ÓXIDO NÍTRICO

 10.56238/MedCientifica-006

Valney Mara Gomes Conde

Pós-Doutorado em Biociências

Instituição: Universidade do Estado do Pará

E-mail: valney.conde@uepa.br

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1179-5246>

Marcos Mickael Gomes Carvalho

Graduando em Medicina

Instituição: Universidade da Amazônia

E-mail: mickaelgomes@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8378-1372>

Wanessa Figueira Nunes de Matos

Graduanda em Medicina

Instituição: Universidade do Estado do Pará

E-mail: wanessa.fndmatos@aluno.uepa.br

Orcid: <https://orcid.org/0009-0009-3308-1373>

Douglas Augusto Melo dos Santos

Graduando em medicina

Instituição: Universidade do Estado do Pará

E-mail: douglas.amdsantos@aluno.uepa.br

Orcid: <https://orcid.org/0009-0009-0376-0017>

Gabriela Reis Duarte

Mestranda em Pós Graduação em Biociências

Instituição: Universidade do Estado do Pará

E-mail: gabrielareis.d97@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6141-9804>



Renê Silva Pimentel

Mestre em Bioengenharia
Instituição: Universidade do Estado do Pará
E-mail: rene.s.pimentel@uepa.br
Orcid: <https://orcid.org/0009-0002-0017-7271>

Glauciney Pereira Gomes

Mestra em Biociências
Instituição: Universidade do Estado do Pará
E-mail: glaucigomes@gmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7107-0570>

Guilherme Augusto Barros Conde

Doutor em Engenharia Elétrica
Instituição: Universidade do Oeste do Pará
E-mail: guilherme.conde@ufopa.edu.br
Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3529-4101>

RESUMO

Historicamente conhecida por suas ações sobre o sistema reprodutor, hoje se sabe que a ocitocina (OT) também pode contribuir para a regulação da homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica. A OT é produzida nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo e liberada para o plasma a partir de terminais neurais da pituitária posterior, no entanto, muitos estudos identificaram locais extracerebrais de produção OT, incluindo o coração e o endotélio vascular. A ativação de seus receptores em células endoteliais, bem como em sistemas hipotalâmicos/hipofisários e cardíaco, pode resultar na produção de óxido nítrico (NO). O presente trabalho teve como objetivo verificar o papel do NO na regulação da secreção de peptídeo natriurético atrial (ANP) estimulada por OT em cultura primária de cardiomiócitos de embriões de camundongos. Para tal, corações de embriões de camundongos Balb C, com 19 a 21 dias de vida intra-uterina, foram isolados e cultivados para os ensaios com OT e demais substâncias interferentes na síntese de NO e GMPc seu segundo mensageiro. A adição de concentrações crescentes de OT (0.1, 1, 10 e 100 μM) induziu aumento proporcional na secreção de ANP e nitrato para o meio, confirmando a ação estimuladora da OT em cardiomiócitos. O bloqueio da liberação de ANP estimulada por OT (10 μM) foi observada após adição de Ornitina Vasotocina (CVI-OVT) (100 μM), um antagonista específico de OT. Este antagonista inibiu a secreção basal de ANP, quando adicionado individualmente, sugerindo que a OT pode atuar via mecanismo autócrino, tônico estimulatório sobre a secreção de ANP. Amplificação da secreção de ANP estimulada por OT (10 μM) foi observada após sua associação com L-NAME, um inibidor da sintase de óxido nítrico (NOS) (600 μM), e ODQ (100 μM), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, sugerindo a ocorrência de feedback negativo nitrérgico na liberação de ANP estimulada por OT no cardiomiócito. Os resultados obtidos mostraram modulação nitrérgica inibidora sobre a secreção de ANP estimulada por OT.

Palavras-chave: Ocitocina. Peptídeo Natriurético Atrial. Óxido Nítrico. Cardiomiócitos.

ABSTRACT

Historically known for its effects on the reproductive system, oxytocin (OT) is now known to contribute to the regulation of cardiovascular and electrolyte homeostasis. OT is produced in the



supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus and released into the plasma from neural terminals in the posterior pituitary. However, many studies have identified extracerebral sites of OT production, including the heart and vascular endothelium. Activation of its receptors on endothelial cells, as well as in the hypothalamic/pituitary and cardiac systems, can result in the production of nitric oxide (NO). The present study aimed to investigate the role of NO in the regulation of OT-stimulated atrial natriuretic peptide (ANP) secretion in primary cultures of mouse embryo cardiomyocytes. For this purpose, hearts from Balb C mouse embryos, 19 to 21 days of intrauterine life, were isolated and cultured for assays with OT and other substances that interfere with the synthesis of NO and its second messenger cGMP. The addition of increasing concentrations of OT (0.1, 1, 10, and 100 μM) induced a proportional increase in the secretion of ANP and nitrate into the medium, confirming the stimulatory action of OT in cardiomyocytes. The blockade of ANP release stimulated by OT (10 μM) was observed after the addition of Ornithine Vasotocin (CVI-OVT) (100 μM), a specific OT antagonist. This antagonist inhibited basal ANP secretion when added individually, suggesting that OT may act via an autocrine, tonic stimulatory mechanism on ANP secretion. Amplification of OT-stimulated ANP secretion (10 μM) was observed after its combination with L-NAME, a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (600 μM), and ODQ (100 μM), a soluble guanylate cyclase inhibitor, suggesting the occurrence of nitrgic negative feedback on OT-stimulated ANP release in cardiomyocytes. The results obtained demonstrated nitrgic inhibitory modulation of OT-stimulated ANP secretion.

Keywords: Oxytocin. Atrial Natriuretic Peptide. Nitric Oxide. Cardiomyocytes.

RESUMÉN

Históricamente conocida por sus efectos sobre el sistema reproductivo, ahora se sabe que la oxitocina (OT) contribuye a la regulación de la homeostasis cardiovascular y electrolítica. La OT se produce en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y se libera al plasma desde las terminales neuronales en la hipófisis posterior. Sin embargo, muchos estudios han identificado sitios extracerebrales de producción de OT, incluyendo el corazón y el endotelio vascular. La activación de sus receptores en las células endoteliales, así como en los sistemas hipotálamo/hipofisario y cardíaco, puede resultar en la producción de óxido nítrico (NO). El presente estudio tuvo como objetivo investigar el papel del NO en la regulación de la secreción del péptido natriurético auricular (ANP) estimulada por OT en cultivos primarios de cardiomiocitos de embriones de ratón. Para este propósito, corazones de embriones de ratón Balb C, de 19 a 21 días de vida intrauterina, fueron aislados y cultivados para ensayos con OT y otras sustancias que interfieren con la síntesis de NO y su segundo mensajero cGMP. La adición de concentraciones crecientes de OT (0,1, 1, 10 y 100 μM) indujo un aumento proporcional en la secreción de ANP y nitrato al medio, confirmando la acción estimuladora de OT en cardiomiocitos. El bloqueo de la liberación de ANP estimulada por OT (10 μM) fue observado después de la adición de Ornitina Vasotocina (CVI-OVT) (100 μM), un antagonista específico de OT. Este antagonista inhibió la secreción basal de ANP cuando fue añadido individualmente, sugiriendo que OT puede actuar a través de un mecanismo estimulador tónico autocrino sobre la secreción de ANP. Se observó una amplificación de la secreción de ANP estimulada por OT (10 μM) tras su combinación con L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) (600 μM), y ODQ (100 μM), un inhibidor soluble de la guanilato ciclase, lo que sugiere la presencia de retroalimentación negativa nitrérgica en la liberación de ANP estimulada por OT en cardiomiocitos. Los resultados obtenidos demostraron una modulación inhibitoria nitrérgica de la secreción de ANP estimulada por OT.

Palabras clave: Oxitocina. Péptido Natriurético Auricular. Óxido Nítrico. Cardiomiocitos.



1 INTRODUÇÃO

Classicamente conhecida por suas ações sobre o sistema reprodutor, hoje se sabe que a OT também pode contribuir para a regulação da homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica (GUTKOWSKA; JANKOWSKI, 2012).

A OT é um hormônio nonapeptídico, com peso molecular 1007 KDa. Sintetizada sob a forma de pró-hormônio (pró-ocitofisina) pelos neurônios magnocelulares dos núcleos paraventriculares (NPV) e supra-ópticos (NSO) do hipotálamo e liberada na circulação a partir da neuro-hipófise. Possui uma vida média na circulação sistêmica de aproximadamente 5-10 minutos. A parte cíclica de sua molécula, com uma ligação dissulfeto (-S-S-), é fundamental para exercer os seus efeitos biológicos (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004).

Os estímulos mais potentes para liberação de OT são: aumento de osmolalidade plasmática, pressão arterial e hipervolemia (KADEKARO et al., 1992). No coração, a OT estimula a liberação de ANP e diminui a força e a frequência de contração, conduzindo a diminuição efetiva do débito cardíaco e, por conseguinte, da pressão arterial. Esta ação pode ser dependente, em parte, da síntese de NO (MUKADDAM-DAHER et al., 2001) ou da liberação de ANP (FAVARETTO et al., 1997), uma vez que ambas as substâncias estimulam a síntese de GMPc, embora, por diferentes enzimas guanilato ciclase (CG) (FAVARETTO et al., 1997). O GMPc pode inibir a contratilidade cardíaca pela diminuição das correntes de cálcio geradas via canais tipo L (TOHSE et al., 1995). Estas correntes participam da liberação de ANP em várias condições estimuladas (REBSAMEN et al., 1997; JIN et al., 2004), sugerindo que o GMPc pode inibir a liberação de ANP por redução dessas correntes. Além disso, a utilização de N (G)-nitro-L-arginina éster metílico (L-NAME), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (FRANDSEN et al., 2001; SANDER et al., 1999), resultou em efeito aditivo sobre a liberação de ANP induzido por angiotensina II (ANG II), a qual foi atenuada por tratamentos de NO ou 8-bromo GMPc em átrios perfundidos de ratos (SOUALMIA et al., 2001), sugerindo que o NO pode agir inibindo a liberação de ANP induzida pela ANGII.

Os mecanismos de ação do NO na célula cardíaca são mediados pelo aumento da concentração da GMPc. O NO tem como alvo na célula cardíaca a enzima CGs. Uma vez ativada, a CGs catalisa a conversão de GTP em GMPc, que consequentemente ativa a proteína cinase G (PKG). A PKG pode inibir o influxo de cálcio para a célula, que ocorre através dos canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana celular (HARTZELL; FISCHMEISTER, 1986; MERY et al., 1991) e pode diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (SHAH et al., 1994; YASUDA; LEW, 1997), provavelmente através da fosforilação da Troponina I (TnI) (LAYLAND et al., 2005), resultando na diminuição da força contrátil e atenuando os efeitos adrenérgicos (LAYLAND et al., 2002).

Além disso, existe evidência de que o NO bloqueie a ação da fosfolipase C, consequentemente inibindo a liberação de cálcio mediada pelo trifosfato de inositol (IP3) (HIRATA et al., 1990;



CLEMENTI et al., 1995). A PKG também inibe a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS), por fosforilar e inibir os receptores de IP₃ presentes em suas membranas (KOMALAVILAS; LINCOLN, 1996). Adicionalmente, o NO induz o aumento do transporte de cálcio pela bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) de maneira independente da GMPc (BUSSE; FLEMING, 2000) e também parece aumentar a fosforilação da proteína fosfolambano durante o relaxamento vascular (KARCZEWSKI et al., 1998). Todos estes efeitos determinam a diminuição da concentração de cálcio livre no citoplasma e conseqüentemente contribuem para o relaxamento muscular.

Esses efeitos atribuídos ao NO tem caráter autócrino nos próprios cardiomiócitos, mediante estímulos variados (HAN et al., 1998; ZIOLO et al., 2001; BAROUCH et al., 2002), mas pode ser também um efeito parácrino do NO, produzido pelas NOS₃ nas células endoteliais (BALLIGAND; CANNON, 1997). Por outro lado, o NO produzido pelas NOS expressas nas varicosidades neuronais determina a diminuição da liberação de noradrenalina e potencializa a liberação de acetilcolina, reforçando a modulação anti-adrenérgica no coração (PATON et al., 2002). O NO endógeno apresenta outros efeitos metabólicos e iônicos por meio de vias independentes do GMPc, como, por exemplo, a inibição da respiração mitocondrial, inibição do transporte de glicose, aumento do transporte dos ácidos graxos livres e ativação da Bomba Na⁺ K⁺ ATPase nos cardiomiócitos (MASSION et al., 2003). O mecanismo pelo qual o NO é removido da GCs após ocorrer a vasodilatação necessária é desconhecido. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilato ciclase solúvel (BECKMAN; KOPPENOL., 1996).

A ocitocina exerce um efeito estimulador, proporcional à dose aplicada, sobre a secreção de ANP diretamente no coração em estudo in vitro, sendo esse efeito revertido pela ação de um antagonista específico de OT. De forma semelhante ao ANP, a OT também apresenta efeito inotrópico e cronotrópico negativo, efeitos esses também mimetizados pelo GMPc, o principal mediador das ações do ANP, provável intermediário das ações da OT no coração (FAVARETTO et al., 1997; GUTKOWSKA et al., 1997).

No entanto, o papel fisiológico da produção de OT cardiovascular é pouco conhecido, algumas evidências suportam a hipótese de que a OT pode agir diminuindo a atividade cardíaca por efeito cronotrópico e inotrópico negativo. Esta ação pode ser dependente, em parte, da síntese de óxido nítrico (NO) (MUKADDAM-DAHER et al., 2001) ou da liberação de ANP (FAVARETTO et al., 1997). Além disso, evidências demonstram que OT, NO e ANP atuam no sistema cardiovascular por intermédio do aumento da produção de GMPc. Este por sua vez é utilizado como mediador do relaxamento vascular, efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos no coração (JANKOWSKI et al., 1998).

Essas evidências nos conduzem a hipótese de que a OT pode participar de mecanismos intrínsecos de regulação da função cardíaca como um sinalizador endócrino, autócrino e/ou parácrino, mediando efeitos inibidores da atividade contrátil e estimuladores da atividade secretória de ANP e



síntese de NO, no entanto, uma ação direta ainda necessita ser confirmada. Adicionalmente, o fato de NO atuar como um possível modulador inibitório da liberação de ANP (LESKINEN et al., 1995) e de suas enzimas estarem presentes no coração (BALLIGAND et al., 1995) priorizamos estudar mecanismos exclusivos dos cardiomiócitos envolvendo a OT e possíveis estímulos mediados por ela sobre a secreção de ANP e síntese de NO a partir do nitrato, um metabólito resultante de sua degradação em cultura primária de cardiomiócitos. Este estudo tem como objetivo estudar possíveis mecanismos nitrérgicos relacionados à regulação da secreção de ANP por ocitocina em cultivo primário de cardiomiócitos de embriões de camundongos.

2 METODOLOGIA

2.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos Balb C, fêmeas, grávidas (19 a 21 dias), provenientes do Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Com peso aproximado de 50 ± 10 g, mantidas em gaiolas comunitárias, em ambiente controlado artificialmente (24±2 °C; 14 horas de luz e 10 horas de escuro) com disponibilidade de água e ração ad libitum.

2.2 CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS

Todos os experimentos foram conduzidos com base em um modelo de cultivo primário de cardiomiócitos (MACHADO et al., 2000). É um cultivo simples de células cardíacas, predominantemente de miócitos de embrião de camundongo (± 21 dias). As células são exigentes quanto a demanda metabólica nutricional, mas resistem bem por vários dias sem troca de meio (± 8 dias).

Os corações de embriões de camundongos Balb C com 19 a 21 dias de vida intra-uterina foram retirados sob anestesia com éter etílico, para cultivo em cada experimento. Em seguida fragmentados em solução refrigerada de Ringer, lavados por 3 vezes seguidas em solução de tampão fosfato a 0,1 % (PBS), sem Ca²⁺ e Mg²⁺, e dissociados em solução de colagenase a 0,01% (tipo II) (Worthington Biochemical Corp) + tripsina a 0,01 % (Gibco-Brl) em PBS (0,1 %) por agitação magnética (10 repetições de 5 min) a 37°C, pH=7,4. Efetuou-se 9 coletas da suspensão de células (10 ml), após o descarte da primeira, nos intervalos das trocas. Estas células em suspensão foram adicionadas em 0,5 ml de soro fetal bovino (Gibco) (inativado a 56 °C/15 min) refrigerado, em seguida levadas à centrifugação por 10 min (4 °C a 1.200 rpm) e o precipitado recuperado em um só frasco com 18 ml de meio DMEM (Dulbecon's modified Eagles's médium) enriquecido com soro fetal bovino (SFB) (5%); soro de cavalo (SH) (10%) inativado (56°C/15min) e extrato de embrião de pinto (1%). Após uma nova centrifugação (10 min a 4°C em 1.200 rpm), o precipitado foi resuspenso em 2 ml do mesmo



meio e uma alíquota de 10 µl foi retirada para contagem das células. Aproximadamente 1.2×10^5 células foram semeadas em placas de cultura com 24 poços (Corning) contendo 1 ml de DMEM enriquecido. Para total aderência das células a superfície do poço foi coberta com um filme de gelatina de porco a 0,001 %. Uma troca de meio foi efetuada 24 horas depois quando se avaliou a viabilidade da cultura. Nesta condição, a maioria das células já apresentaram batimentos discretos, os quais, tenderam a aumentar de intensidade com o avanço dos dias e seu crescimento em estufa programada para uma atmosfera de 5% de CO₂ (misturado ao ar atmosférico) a 37 °C.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os cardiomiócitos foram incubados por 96 horas com DMEM enriquecido (5% (SFB) e 10% HS). Depois desse tempo, o meio foi substituído por DMEM sem soro e incubados por 60 minutos para normalizar os níveis basais de ANP. Em seguida, mais 15 min para o ensaio com substâncias testes. Essa sequência temporal foi seguida para todos os experimentos. Foram submetidas duas placas de cultura, reservando-se a primeira coluna para o controle e o restante das colunas para as substâncias testes. O meio de incubação foi retirado de cada intervalo e armazenado em freezer a -70 °C para quantificação de ANP e nitrato.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ANP

A quantificação de ANP foi realizado por radioimunoensaio com duplo anticorpo segundo método descrito por GUTKOWSKA et al. (1984), no Laboratório de Neuroendocrinologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP).

O radioimunoensaio consiste na preparação de uma curva-padrão, feita ensaiando-se 100 µl de padrões ANF com diluição seriada de 0.76 a 195.3 pg/tubo (1-28- Peninsula®), 100µl de tampão ANP [Na₂HPO₄ 7 H₂O – monofosfato bibásico de sódio heptahidratado, 134.04 g/l (Dinâmica Reagentes®); NaH₂PO₄ .H₂O - fosfato de sódio monobásico monohidratado, 69 g/l (Dinâmica Reagentes®); NaCl - cloreto de sódio, 2.92g/l (Dinâmica Reagentes®); Albumina Bovina Fração V, 1.0 g/l (SIGMA® A-8022); Triton X-100, 1.0ml (SIGMA® T-8787); Polietilenoglicol, 6,25% (PEG PM 6000 - REAGEN®) e NaN₃ – azida de sódio, 0.01% (SIGMA® S-8032); 100µl de anticorpo primário (ANF de coelha anti-rata, antigamaglobulina de rata produzida em coelha- rabbit anti-rat alpha ANF, diluição 1:60.000- conseguido por imunização na FMRP/USP), diluído com soro de coelho normal 1%, 100µl de hormônio marcado (125I- ANF (1-28) e a reação foi completada com 100µl de segundo anticorpo (ANF de cabra anti-coelho, antigamaglobulina de coelha produzida em cabra, diluição de 1: 20.000 – fabricada por imunização na FMRP/USP), seguido de incubação “overnight” de 4 dias a 4 °C. Ao final adicionou-se 1 ml de polietilenoglicol, 6,25% (PEG PM 6000 - REAGEN®) refrigerado para acelerar a precipitação do complexo formado. Centrifugou-se em centrifuga



refrigerada 4 °C (Mod. 3 K10 – SIGMA®), por 25min a 3.000 rpm e o sobrenadante foi aspirado e a radioatividade do precipitado contada em cpm no contador Gama (Cobra 5002-PACKARD□) com eficiência de contagem maior que 72%.

As concentrações de ANP nas amostras foram obtidas a partir da curva-padrão anteriormente descrita. Amostras de mesmo grupo foram quantificadas em único ensaio para evitar variações interensaios. As amostras foram quantificadas em duplicata, utilizando-se duas curvas-padrão, sendo uma lida no início e outra no final da leitura do ensaio, para controle de pipetagem. Esses dois procedimentos, também são importantes para o controle intra-ensaio.

2.5 DOSAGEM DE NITRATO (NO₃)

A determinação da concentração de nitrato também foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) pela técnica de quimioluminescência, através de um analisador de óxido nítrico (Nitric Oxide Analyzer, NOATM280, Sievers Instruments, Inc., Colorado, USA), segundo método descrito por HAMPL et al. (1996).

Após cada protocolo experimental alíquotas de 5 □l destas amostras foram injetados na câmara de reação onde o nitrato reage com o cloreto de vanádio formando NO, o qual, por sua vez reage com o O₃ formando dióxido de nitrogênio (NO₂-). O NO₂- apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. Isso gera corrente de elétrons que é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico digital, dando origem ao traçado gráfico. A área contida no traçado é então demarcada e quantificada pelo programa NOAnalysis™ Software (version 3.00PNE) de funcionamento exclusivo do sistema de análise. O coeficiente de correlação para as curvas padrões variou entre 0,98 a 1,0 e a dose mínima detectável foi de 0,5 µM.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados com média ± erro padrão da média (EPM). O teste estatístico aplicado foi ANOVA seguido do teste Newman-Keuls ou teste “t” de Student, para comparações entre grupos. As determinações das diferenças estatisticamente significantes levaram em conta p<0,05 sendo * p<0,05, ** p<0,01 para comparações com o grupo controle e + p<0,05, ++ p<0,01 para comparações entre grupos tratados.

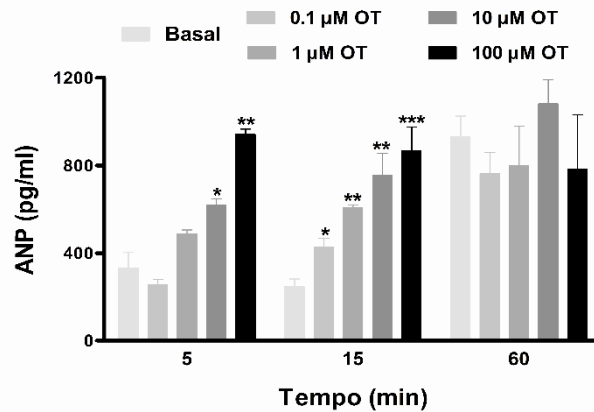
3 RESULTADOS

Quanto aos efeitos sobre a concentração de Basal de ANP e Nitrato, a administração de OT induziu nos tempos 5 e 15 min um aumento dose-dependente (0,1, 1, 10 e 100 µM) na liberação de ANP para o meio (Figura 1). Os efeitos de OT na liberação do ANP começou 5 min após a adição das



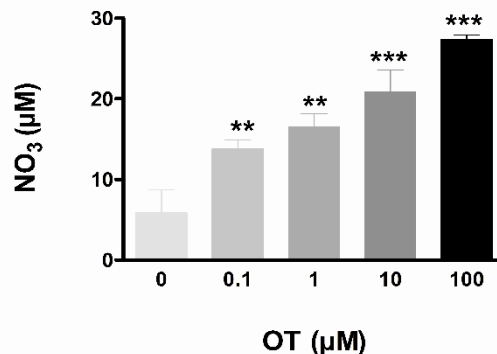
doses de 10 e 100 μM , e foram mantidos aos 15 min, quando todas as doses induziram aumento significativo e, finalizando aos 60 minutos, quando nenhuma alteração mais significativa foi detectada. Por sua vez, a liberação de nitrato dependente da dose, ocorreu somente em 15 min para todas as doses testadas da OT (Figura 2).

Figura 1. Efeitos da administração de ocitocina (OT) na liberação de ANP (n=6). Os valores são apresentados em média \pm EPM. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 para comparações entre tratado versus basal no mesmo grupo de células.



Fonte: Conde et al., 2024

Figura 2. Efeitos da administração de ocitocina (OT) na liberação de nitrato (NO_3) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM. ((n=6) * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 para comparações entre tratado versus basal no mesmo grupo de células.



Fonte: Conde et al., 2024

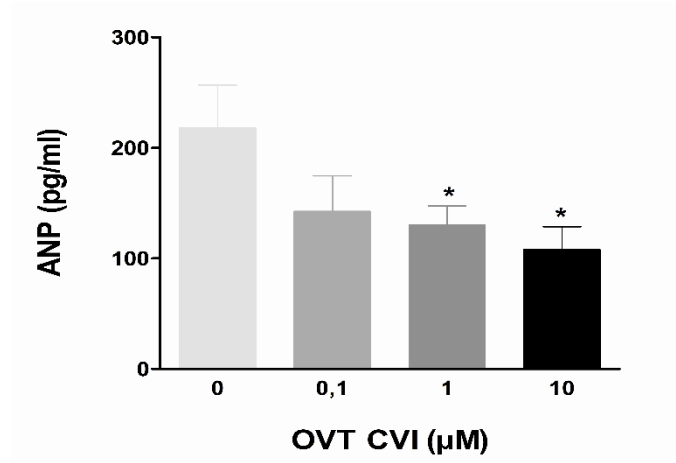
Verificamos a ocorrência de algum efeito intrínseco da OT cardíaca sobre a secreção de ANP, adicionou-se CVI-OVT (0,1, 1,10 μM), um antagonista específico para receptores de OT. Uma significativa diminuição da liberação de ANP ocorreu somente após a administração da dose de 1 μM mas, sem diferença de magnitude com a concentração 10 vezes maior, após 15 min de observação (Figura 3), sugerindo um efeito limitado por contínua e baixa liberação de OT constitutiva para o meio.

Quanto aos efeitos do bloqueio de receptores de OT sobre a secreção de ANP estimulada por OT, verificou-se uma diminuição da liberação de ANP decorridos 15 min da adição do antagonista individualmente na dose de 100 μM . Quando associado com OT foi demonstrado o bloqueio (CVI-OVT 100 μM) da estimulação ocitocinérgica sobre a liberação de ANP (Figura 4). Esta substância foi



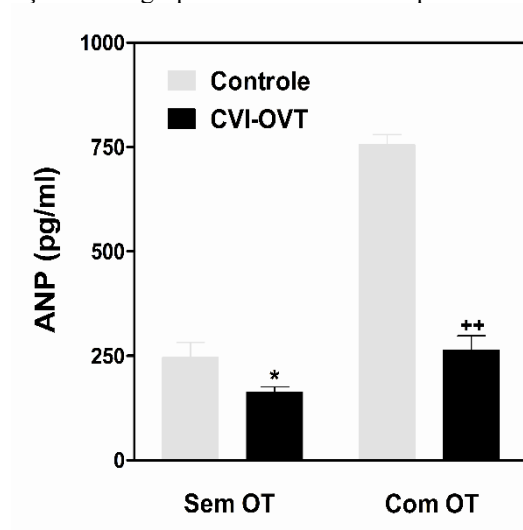
eficaz em inibir a liberação de ANP induzida por OT (10 μ M). Comprovando a especificidade dos efeitos de OT.

Figura 3. Efeitos da administração individual de antagonista de OT na liberação de ANP basal após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ para comparações entre tratado versus controle.



Fonte: Conde et al., 2024

Figura 4. Efeitos da administração de CVI-OVT (100 μ M) na liberação basal de ANP (sem OT) ou induzido por OT (com OT) em condições de equimolaridade (10 μ M) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ para comparações entre tratado versus controle. + $p<0,05$; ++ $p<0,01$ para comparações entre grupos tratados versus respectivos controles.



Fonte: Conde et al., 2024

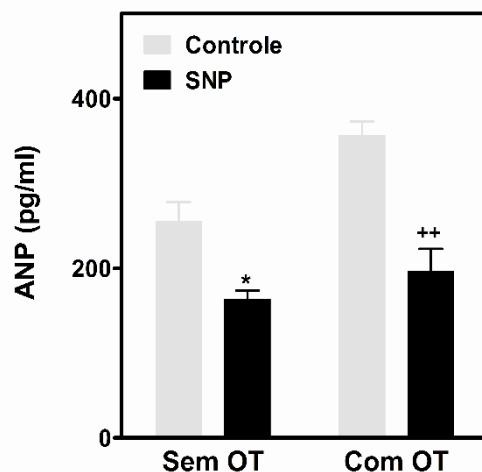
Para verificarmos possíveis efeitos do aumento da produção de NO na secreção de ANP basal ou induzida por OT foi adicionado SNP (600 μ M), um doador de NO, individualmente ou associado à OT (10 μ M). Uma significativa diminuição da liberação de ANP foi obtida após adição do doador de NO, em ambas as condições experimentais decorridos 15 min de observação (Figura 5).

Com o objetivo de estudar possíveis efeitos da diminuição da produção de NO na secreção de ANP basal ou estimulada por OT (10 μ M), utilizou-se L-NAME (600 μ M), um inibidor inespecífico



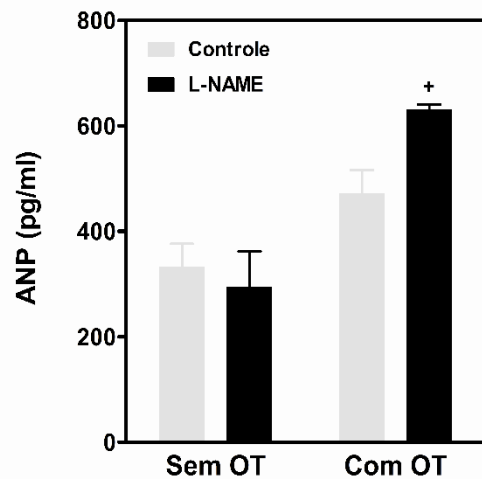
de NOS. Amplificação significativa da secreção de ANP estimulada por OT foi observado após 15 min de observação (Figura 6).

Figura 5. Efeitos da administração de SNP (600 μ M) na liberação de ANP basal (sem OT) ou estimulada por OT (10 μ M) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM (n=6). p <0,05; ** p<0,01 para comparações entre tratado versus controle. + p<0,05; ++ p<0,01 para comparações entre grupos tratados versus respectivos controles.



Fonte: Conde et al., 2024

Figura 6. Efeitos da administração de L-NAME (600 μ M), um inibidor inespecífico da NOS, na liberação de ANP basal (sem OT) ou estimulada por OT (10 μ M) (com OT) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM (n=6). + p<0,05; ++ p<0,01 para comparações entre grupos tratados versus respectivos controles.

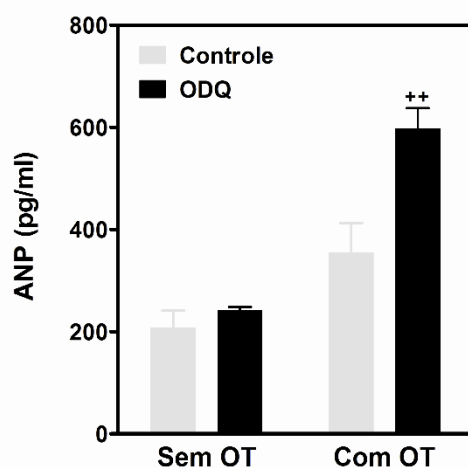


Fonte: Conde et al., 2024

Buscou-se avaliar a participação de GMPc na modulação nitrérgica da secreção de ANP basal ou estimulada por OT (10 μ M) adicionando um inibidor da CGs (100 μ M ODQ). Um efeito aditivo desta substância foi observado somente sobre a secreção de ANP estimulada por OT (Figura 7).



Figura 7. Efeitos da administração de ODQ (100 μ M), um inibidor da CGs, na liberação de ANP basal (sem OT) ou estimulada por OT (10 μ M) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM (n=6). + p<0,05; ++ p<0,01 para comparações entre grupos tratados *versus* respectivos controles.



Fonte: Conde et al., 2024

4 DISCUSSÃO

Os resultados confirmaram, em cardiomiócitos isolados, a ação estimulatória da OT na secreção de ANP (Figura 1), evidenciada por outros estudos *in vivo* (GUTKOWSKA et al., 1997) e, *in vitro*, em preparação de coração isolado (FAVARETTO et al., 1997). A diminuição da secreção basal de ANP e a anulação do efeito estimulatório de OT, resultante da adição de um antagonista específico, sugere a especificidade da ação hormonal e a ocorrência de uma regulação tônico-estimulatória de OT, em uma atípica regulação autócrina (Figura 3). No entanto, não obtivemos sucesso na tentativa de medir a concentração de OT no meio (dados não mostrados), sugerindo que essa ação dependa de condições particulares de regulação para ocorrer, desde que a síntese de OT pelo cardiomiócito foi evidenciada por outros estudos (JANKOWSKI et al, 1998; GUTKOWSKA et al., 2000; PETERSSON et al, 2002)

O aumento da secreção de ANP estimulada por OT foi acompanhada por aumento proporcional de nitrato no meio, relacionando a produção de NO a estes efeitos (Figura 2). Este antagonista também induziu diminuição significativa na liberação ANP basal, quando administrado sozinho, sugerindo a ocorrência da regulação autócrina de OT por um mecanismo tônico estimulatório.

De fato, estes resultados confirmam efeitos de OT na liberação de ANP demonstrado por alguns estudos. As concentrações plasmáticas de ANP aumentaram após injeção ip (20 min) ou iv (5 min) de OT em ratos acordados. Essas mudanças foram relacionadas ao aumento da osmolaridade urinária, natriurese, e caliurese induzido por injeção de OT via i.p (HAANWINCKEL et al., 1995). Ainda, a OT também promoveu um aumento na concentração de ANP no efluente, efeito este completamente bloqueado pela perfusão com um antagonista de receptores de OT, que resultou na redução da concentração de ANP no efluente para valores inferiores aos basais (GUTKOWSKA et al., 1997). Reforçando estes dados, estudos demonstram que a incubação de átrios isolados de ratos com OT



(1 μ M) resultaram no aumento da secreção de ANP, efeito mais uma vez bloqueado por um antagonista de receptores ocitocinérgicos, o qual também manteve a secreção de ANP em níveis inferiores ao controle (FAVARETTO et al., 1997). Nossos resultados também reproduziram os efeitos do antagonista de OT em reduzir a liberação de ANP em cardiomiócitos para valores inferiores aos basais (Figura 10), o que sugere a participação de um sistema ocitocinérgico cardíaco no controle da secreção atrial de ANP (FAVARETTO et al., 1997; GUTKOWSKA et al., 1997).

Estudos subseqüentes mostraram que a OT é sintetizada, armazenada e liberada de cardiomiócitos. O conteúdo de OT mensurado em culturas de células e coletado após 1 h de incubação em média 228 ± 55 pg / ml do meio e 53 ± 3 proteína pg/mg nas células. Estes autores verificaram a expressão de mRNA específico de OT em câmaras diferentes de coração de rato (JANKOWSKI et al., 1998). Além disso, os níveis de mRNA para receptores OT nos átrios foram encontrados em maior quantidade do que nos ventrículos, no global os níveis de mRNA de receptores de OT foram calculados como sendo, pelo menos, 10 vezes mais baixo do que o nível de mRNA de receptor OT presente no útero de ratas (JANKOWSKI, et al 1998).

No entanto, é possível que fatores ainda desconhecidos modulem a síntese e secreção cardíaca de ocitocina, controlando a concentração tecidual deste peptídeo, o qual poderia assim atingir níveis elevados, capazes de influenciar a função elétrica e mecânica do coração, além de sua função endócrina, considerando o fato de camundongos depletados do gene da ocitocina apresentarem elevada frequência cardíaca intrínseca (MICHELINI et al., 2003).

O uso de um bloqueador da síntese de NO (L-NAME) potenciou a secreção de ANP estimulada (mas não basal) por OT (Figura 6) e, em contraste, o uso de um doador (SNP) inibiu tanto a secreção basal como a estimulada (Figura 5), confirmando nos cardiomiócitos, a regulação inibitória de NO sobre a liberação de ANP.

De fato, estes resultados confirmaram efeitos de NO na inibição da liberação de ANP demonstrado por estudos *in vivo*. Evidenciaram que o NO liberado do endocárdio inibiu a secreção de ANP, desde que o uso de um bloqueador da síntese de NO (L-NAME) resultou em aumento da secreção de ANP basal ou induzida por estiramento (LESKINEN et al., 1995). Outras evidências mostraram que o NO inibiu a expressão atrial de mRNA para ANP (LEE et al., 2000). Estes resultados mostram que a simples inibição da síntese de NO é capaz de estimular a liberação de ANP sugerindo um mecanismo tônico inibidor do NO sobre a liberação basal ou estimulada de ANP. É pertinente ressaltar, no entanto, que o efeito da inibição da síntese de NO foi mais eficaz na condição estimulada por OT, sugerindo que algum mecanismo inibidor intrínseco deva estar limitando a produção de NO na condição constitutiva.



O mecanismo utilizado pelo NO para produzir esse efeito inibidor pode depender da síntese de GMPc, via ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, como demonstrado em nossos resultados pelo aumento da liberação de ANP resultante a adição de ODQ, um inibidor específico dessa enzima.

O GMPc regula preponderantemente de forma inibitória o metabolismo celular por interferir negativamente em sinalizações que aumentem a concentração de íon cálcio livre no citoplasma (DOMEK-LOPACINSKA; STROSZNAJDER., 2005), cuja resultante é a diminuição de cálcio livre no citoplasma (TOHSE et al., 1995),

O aumento da concentração de nitrato (basal) e a amplificação da liberação de ANP induzida por OT após administração de L-NAME (Figura 6) ou ODQ (Figura 7) observados em nos nossos resultados, indicam que o NO pode atuar por um feedback negativo via a produção de GMPc limitando a liberação de ANP induzida por baixas concentrações de OT (concentrações cardíacas basais de OT).

Esta hipótese é corroborada por evidências que demonstraram efeito cronotrópico e inotrópico negativo em coração isolado em atividade espontânea (FAVARETTO et al., 1997). Efeitos mimetizados pela adição de 8-bromoguanosina monofosfato cíclica (8-bcGMP), sugerindo que GMPc atuou mediando estas respostas (FAVARETTO et al., 1997).

No entanto é difícil pensarmos serem os efeitos inotrópico e cronotrópico negativo resultante de uma ação direta da OT sobre os cardiomiócitos. Afinal, o receptor de OT é acoplado à proteína Gq e, conseqüentemente, sua ativação resulta na estimulação da fosfolipase C, geração de inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol, resultando na liberação do íon cálcio de reservas intracelulares (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Todavia, é possível que a ativação de receptores ocitocinérgicos nos cardiomiócitos, resulte na ativação da enzima NOS e aumento na síntese de óxido nítrico (NO) que, por sua vez, pode estimular a enzima guanilato ciclase solúvel, resultando na maior síntese de GMPc nestas células. De fato, um aumento tanto nos níveis de NO, como de GMPc resulta em efeito inotrópico negativo, que pode ser explicado com base na ativação de proteína cinases dependentes de GMPc, as quais inibem a síntese de ATP e fecham canais de cálcio dependentes de voltagem (BRUTSAERT, 2003). Além disso, é possível que outras vias utilizadas por GMPc possam ativar a fosfodiesterase II (PEDII) que reduziria a concentração citosólica de AMPc, o que promoveria a inibição da proteína quinase A (PKA) com conseqüente efeito inotrópico e cronotrópico negativo (MASSION et al., 2003). Além desses efeitos cardíacos, OT e ANP atuaram promovendo aumento da excreção de sódio e potássio renal por mecanismos dependentes do aumento da síntese de GMPc (SOARES et al., 1999).

Outras investigações revelaram que a secreção de ANP estimulada por ANG II, também foi amplificado por L-NAME, e, atenuada por tratamento com NO ou 8-bcGMP. Adicionalmente, aumento ou diminuição nos níveis de GMPc ocorreram depois do tratamento com ANG II ou L-NAME, respectivamente (SOUALMIA et al., 2001). Estes resultados mostram que, a semelhança para



OT, NO e GMPc podem modular negativamente efeitos de ANG II, sugerindo a existência de um feedback negativo sobre a liberação de ANP induzida por este hormônio. Além do mais, o fato de 8-bromo GMPc não ter induzido quaisquer alterações na secreção basal de ANP pode indicar, que independente da via de síntese, o GMPc não participa da regulação basal de secreção de ANP.

A participação de NO na ação cronotrópica e ionotrópica negativa induzida por OT foi confirmada em estudo semelhante, onde o L-NAME inibiu significativamente efeitos cronotrópico e ionotrópico negativo induzidos por OT (MUKADDAM-DAHER et al., 2001; ONDREJCAKOVA et al., 2009). No entanto, o uso de um bloqueador inespecífico das NOS, geralmente induz um efeito ionotrópico negativo sobre a célula cardíaca e sobre o coração. Isto é, provavelmente, consequência do bloqueio de NOS1 e NOS3, já que em condições normais a expressão de NOS2 é inexistente ou muito pequena para ser considerada responsável por este efeito. O uso de um bloqueador inespecífico de NOS (L-NAME) poderia demonstrar apenas a consequência do bloqueio da isoforma predominante. De fato, a existência de microdomínios para isoformas NOS1 e NOS3 em caveolas no sarcolema e retículo sarcoplasmático, respectivamente, mostram que ambas as isoformas podem regular o fluxo de Ca^{2+} reforçado pela ativação de receptores β -adrenérgicos (PATON et al., 2002) Além disso, é possível que a inibição da entrada de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} tipo-L mediada pela isoforma NOS1 possa ser um provável mecanismo através do qual NO regule a contração e estoques de Ca^{2+} intracelulares, sugerindo que o NO produzido por esta isoforma possa exercer uma regulação de feedback negativo no influxo de Ca^{2+} (SEDDON et al., 2007). Em contrapartida, estudos demonstraram efeitos opostos das isoformas NOS1 e NOS3, na atividade basal do coração. Os autores sugeriram que este efeito deve-se à compartimentalização destas enzimas na célula cardíaca (BAROUCH et al., 2002). No entanto, ainda é difícil saber com precisão qual o efeito que cada isoforma tem sobre a contratilidade cardíaca basal frente aos resultados conflitantes existentes.

Em contraste, há evidências de que o NO pode inibir as correntes de cálcio tipo L via GMPc (CAMPBELL et al., 1996) e que essas correntes são necessárias para a liberação de ANP, em condições estimuladas (REBSAMEN et al., 1997, JIN et al., 2004). Corroborando o fato de que o NO pode atuar de forma direta diminuindo a corrente de cálcio via canais voltagem-dependente de membrana (HU et al., 1997), reforçando a hipótese de uma ação inotrópica negativa nitrérgica em cardiomiócitos pela adição de doadores de NO (WAHLER; DOLLINGER, 1995; FLESCHE et al., 1997).

Outra possibilidade seria considerarmos os efeitos cardíacos do ANP, que ao interagir com seus receptores promove a ativação de guanilato ciclase. De fato, estudos sugerem que o ANP, isoladamente, inibe atividade do canal Ca^{2+} tipo L cardíaco através da produção intracelular de GMPc e, em seguida, a ativação de PKG, uma vez que 8-bcGMP reproduziu os efeitos de ANP em células ventriculares isoladas de coração de coelho (TOHSE et al., 1995). Estes dados são sugestivos de que



ANP e NO atuam por efeitos complementares inibindo a contratilidade do miocárdio via atividade de GMPc e PKG.

Por fim, podemos sugerir que a liberação de ANP a partir dos cardiomiócitos pode diminuir a atividade cardíaca estimulada por OT, assim como o aumento de NO induzido por OT resultaria em inibição da liberação de ANP, uma vez que o NO pode atuar por um mecanismo de feedback negativo via a produção de GMPc limitando a liberação de ANP induzida por OT, estabelecendo, por conseguinte, um limite de produção de ANP. De fato, a ação do ANP pode ser limitada por NO, que também pode ser produzido no coração, a partir de suas enzimas NOS que estão presentes nos cardiomiócitos (BALLIGAND et al., 1995), o qual pode modular a ação de ANP via OT, com aumento da produção de NO e consequente aumento da síntese de GMPc. O aumento da disponibilidade de GMPc no citoplasma é suficiente para inibir a liberação de ANP, desde que a administração de 8-bromo GMPc, um análogo que permeia a membrana celular, induziu diminuição da liberação de ANP em coração perfundido isolado *in vitro* (FAVARETTO et al., 1997).

5 CONCLUSÃO

O presente estudo nos revelou que a OT estimulou a secreção basal de ANP que foi inibida por seu antagonista específico, evidenciando possível mecanismo de regulação estimuladora intrínseca no cardiomiócito.

A OT estimulou a produção de NO concomitantemente a de ANP. O NO produzido exibiu efeito inibidor sobre a secreção de ANP basal ou estimulada por OT. Um efeito dependente da síntese de GMPc via guanilato ciclase solúvel. Revelando que a OT pode estimular a secreção de ANP e a produção de NO concomitantemente. O NO pode ativar a guanilato ciclase solúvel, que, por sua vez, sintetiza GMPc a partir de GTP. O aumento da produção de GMPc pode resultar na inibição da liberação de ANP por ativação de PKG

Por fim, novas abordagens experimentais deverão ser conduzidas visando avaliar com mais profundidade essa relação de dependência ou regulação entre esses mensageiros e seu papel na regulação de ANP no cardiomiócito.



REFERÊNCIAS

- ANTUNES-RODRIGUES, J., CASTRO, M., ELIAS, L.L.K., VALENÇA, M.M., McCANN, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews*, v.84, p.169-208, 2004.
- BALLIGAND, J. L., CANNON, P. J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 7, p. 1846-58, 1997.
- BALLIGAND, J.L., KOBZIK, L., HAN, X., KAYE, D.M., BELHASSEN, L., O'HARA, D.S., KELLY, R.A., SMITH, T.W., MICHEL, T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 270, n. 24, p. 14582-14586, 1995.
- BALLIGAND, J.L., KOBZIK, L., HAN, X., KAYE, D.M., BELHASSEN, L., O'HARA, D.S. , et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem*; v. 270, p. 14582-6, 1995.
- BALLIGAND, J.L. Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 30, n. 2, p. 303-315, 1998.
- BAROUCH, L.A., HARRISON, R.W., SKAF, M.W., ROSAS, G.O., CAPPOLA, T.P., KOBEISSI, Z. A., HOBAL, I.A., LEMMON, C.A., BURNETT, A.L., O'ROURKE, B., RODRIGUEZ, E.R., HUANG, P.L., LIMA, J.A., BERKOWITZ, D.E., HARE, J.M. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.*, v. 416, p. 337-339, 2002.
- BUSSE, R., FLEMING, I. Nitric Oxide and Regulation of Vascular Tone. In: MAYER, B., (Ed.). *Nitric Oxide*. Berlin: Springer, p. 179-206, 2000.
- CAMPBELL, D. L.; STAMLER, J. S.; STRAUSS, H. C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J. Gen. Physiol*, v. 108, n. 4, p. 277-293, 1996.
- CLEMENTI, E., VECCHIO, I., SCIORATI, C., NISTICÒ, G. Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ release in neurosecretory PC-12 cells: inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Mol. Pharmacol.*, v. 47, n. 3, p. 517-524, 1995.
- FAVARETTO, A.L.V., BALLEJO, G.O., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W.I.C., GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S.M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*, v.18, n.9, .1377-1381, 1997.
- GIMPL, G., FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiological Reviews*, v.81, n.2, p.629-683, 2001.
- GUTKOWSKA J, JANKOWSKI M. Oxytocin revisited: Its role in cardiovascular regulation. *Journal of Neuroendocrinology.*, v. 24, p.559-608, 2012.
- GUTKOWSKA, J., JANKOWSKI, M., MUKADDAM-DAHER, S., MCCAN, S.M. Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, p.625-633, 2000.



- JIN, J.Y., WEN, J.F., LI, D., CHO, K.W. Osmoregulation of atrial myocytic ANP release: osmotransduction via cross-talk between L-type Ca²⁺ channel and SR Ca²⁺ release. *Am J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 287, p. R1101- R1109, 2004.
- HAANWINCKEL, M.A., ELIAS, L.K., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.92, p.7902-7906, 1995.
- HAMPL, V., WALTERS, C. L., ARCHER, S. L. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Feelisch, M. Stamler, J. S. (Eds). *Methods in Nitric Oxide Research*. Wiley, New York, p.309-318, 1996.
- HAN, X., KUBOTA, I., FERON, O., OPEL, D. J., ARSTALL, M.A., ZHAO, Y.Y., HUANG, P., FISHMAN, M.C., MICHEL, T., KELLY, R. A. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte ICa-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 95, p. 6510-6515, 1998.
- HARTZELL, H. C., FISCHMEISTER, R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca²⁺ current in single heart cells. *Nature*, v. 323, n. 6085, p. 273-275, 1986.
- HIRATA, M. KOHSE, K. P., CHANG, C.H., IKEBE, T., MURAD, F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 3, p. 1268-1273, 1990.
- JANKOWSKI, M., HAJJAR, F., KAWAS, S.A., MUKADDAM-DAHER, S., HOFFMAN, G., MCCANN, S.M., GUTKOWSKA, J. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.95, p.14558-14563, 1998.
- KADEKARO, M., SUMMY-LONG, J.Y., HARRIS, J.S., TERRELL, M.L., FREEMAN, S., EISENBERG; H. M. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretion during progressive deprivation in rats. *Am. J. Physiol.*, v.262, p. 310-317, 1992.
- KARCZEWSKI, P., HENDRISCHKE, T., WOLF, W.P., MORANO, I., BARTEL, S., SCHRADER, J. Phosphorylation of phospholamban correlates with relaxation of coronary artery induced by nitric oxide, adenosine, and prostacyclin in the pig. *J. Cell Biochem.*, v. 70, n. 1, p. 49-59, 1998.
- KOMALAVILAS, P., LINCOLN, T. M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 36, p. 21933-21938, 1996.
- LESKINEN, H., VUOLTEENAHO, O., LEPPALUOTO, J. AND RUSKOAHO, H. Role of nitric oxide on cardiac hormone secretion: Effect of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release. *Endocrinology.*, v.136, n. 3, p.1241-1249, 1995.
- MACHADO, F.S., MARTINS, G.A., ALIBERTI, J.C., MESTRINER, F.L., CUNHA, F.Q., SILVA, J. S. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.*, v. 102, p. 3003-3008, 2000.
- MASSION, P.B., FERON, O., DESSY, C., BALLIGAND, J.L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.*, v. 93, n. 5, p. 388-398, 2003.



- MERY, P. F., LOHMANN, S.M., WALTER, U., FISCHMEISTER, R. Ca^{2+} current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 88, n. 4, p. 1197- 1201, 1991.
- MUKADDAM-DAHER, S., YIN, Y.L., ROY, J., GUTKOWSKA, J., CARDINAL, R. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension.*, v.38, p.292-296, 2001.
- PATON, J.F., KASPAROV, S., PATERSON, D. J. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci.*, v. 25, p. 626–631, 2002.
- PETERSSON, M. Cardiovascular effects of oxytocin. *Prog Brain Res.*,v.139, p. 281-288, 2002.
- REBSAMEN, M.C., CHURCH, D.J., MORABITO, D., VALLOTTON, M.B., LANG, U. Role of cAMP and calcium influx in endothelin-1-induced ANP release in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.*, v. 273, p. E922-E931, 1997
- SANDER, M., CHAVOSHAN, B., VICTOR, R.G. A large blood pressure raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. *Hypertension.*, v. 33, p. 937-942. 1999.
- SEARS, C. E.; ASHLEY, E. A.; CASADEI, B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philosophical Transactions Royal Society of London*, London, v.359: p.1021-1044, 2004.
- SHAH, A. M. et al. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.*, v. 74, n. 5, p. 970-978, 1994.
- SOARES, T.J., COIMBRA, T.M., MARTINS, A.R., PEREIRA, A.G.F., CARNIO, E.C., BRANCO, L.G.S., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W.I.C., NUCCI, G., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., McCAN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.96, p.278-283, 1999.
- SOUALMIA, H., BARTHELEMY, C., EURIN, J., MASSON, F., CARAYON, A. Role of nitric oxide on atrial natriuretic peptide release induced by angiotensin II in superfused rat atrial tissue. *Regul Pept.*, v. 98, p. 105-110. 2001.
- TOHSE, N., NAKAYA H, TAKEDA Y, KANNO, M. Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca^{2+} channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. *Br J. Pharmacol*, v. 114, p. 1076-1082, 1995.
- YASUDA, S. LEW, W. Y. Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca^{2+} in cardiac myocytes. *Circ. Res.*, v. 81, n. 6, p. 1011-1020, 1997.
- WAHLER, G. M., DOLLINGER, S. J. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.*, v. 268, n. 1 Pt 1, p. C45-C54, 1995
- ZIOLO, M.T., KATOH, H., BERS, D. M. Expression of inducible nitric oxide synthase depresses β -adrenergic-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum in intact ventricular myocytes. *Circulation.*, v. 104, p. 2961–2966, 2001.