

VALNEY MARA GOMES CONDE

MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA REGULAÇÃO OCITOCINÉRGICA DA
SECREÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL EM
CARDIOMIÓCITOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz.

Área de Concentração: Neurociências

Belém-Pará

-2013-

VALNEY MARA GOMES CONDE

MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA REGULAÇÃO OCITOCINÉRGICA DA
SECREÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL EM
CARDIOMIÓCITOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito
para obtenção do grau de Doutor em Ciências. - Área de
Concentração: Neurociências

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Anderson Manuel Herculano Oliveira da Silva
Universidade Federal do Pará - PPG-NBC, ICB, Belém-Pará

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista
Universidade Federal do Pará - PPG-NBC, ICB, Belém-Pará

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha
Universidade Federal do Pará - PPG-NBC, ICB, Belém-Pará

Profa. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Universidade Federal do Pará - PPG-NBC, ICB, Belém-Pará

Belém-Pará

-2013-

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Biblioteca da UFPA, Belém – PA

Conde, Valney Mara Gomes

Modulação Nitrérgica na Regulação Ocitocinérgica da Secreção do Peptídeo Natriurético Atrial em Cardiomiócitos/ Valney Mara Gomes Conde, - 2013

Orientador: Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz, Belém-Pa, 2013

83f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém-PA, 2013.

1. Ocitocina 2. Peptídeo Natriurético Atrial 3. Óxido Nítrico 4. Cardiomiócitos

I. Título

CDD - 20. ed. 615.90072

Dedico este trabalho aos meus grandes incentivadores e companheiros de todas as horas: Guilherme e a minha filha Samara.

No que tange a realização de todos os planos “Bs” para a realização de minhas atividades, divido o mérito com o Prof. Domingos Diniz, o qual representa a alma deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Neste longo caminho que tenho percorrido as dificuldades, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força. Tenho muito a agradecer:

Ao Guilherme, meu esposo, pelo companheirismo durante esta jornada, pela compreensão, amor, dedicação e paciência.

A minha filha Samara, que nasceu durante os anos em que desenvolvi este trabalho e irradia amor em seu olhar e sorriso, fazendo com que os dias mais exaustivos fossem esquecidos no momento em que a encontrava no final do dia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz, por ter confiado em mim, ter me dado total e irrestrito subsídios para que eu fizesse o melhor doutorado possível. Pela paciência, apoio e ensinamentos oferecidos desde o início da minha iniciação científica, graduação e pós-graduação (TCC, especialização, mestrado e continuando...). Por sempre ter me oferecido amizade, amparo e, sobretudo, ser exemplo de cientista e ser humano.

Ao Prof. Dr. Antunes Rodrigues que gentilmente nos forneceu subsídios para a realização deste trabalho.

A minha família, em especial a minha mãe pela minha existência e sua dedicação aos meus irmãos. Aos meus irmãos Ivonnaldo, Vilmar, Marcos, Mary e Gláucia que sempre me deram força, apesar de estarem distantes.

A todos os colegas do laboratório de neuroendocrinologia que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESPA pelo apoio financeiro.

O Sentido do Conhecimento

*A fusão de dois destinos em um,
e mil outros a vagar na tentativa de perpetuar
o sentido de ser entre tantos outros mundos um.
Me faz viajar em pensamento para acalantar a dor do medo
daquilo que não sei, como se tudo inspirasse escuridão.
Medo... como se fossem sonhos... jardins encantados
de inebriantes fantasias a desmanchar-se ao toque.
Medo, a eterna viagem do conhecimento passa pelas tuas entranhas.
A fraterna prisão do ilimitado a si confere gloriosos louros (incandescentes).
E o sentido de tudo, a essência de todas as verdades,
a pureza das mais belas fantasias perde o encanto.
Quisera poder despir-me destas armaduras
e permitir que o sopro da vida
incorpore-se a mim.
E permitir em mim a busca das minhas verdades.
E ocupar no espaço nada além do sentido daquilo que é.
E sentir no conhecimento a mais graciosa das paixões.*

Domingos Diniz

RESUMO

CONDE, V. M. G. **Modulação Nitrérgica na Regulação Ocitocinérgica da Secreção do Peptídeo Natriurético Atrial em Cardiomiócitos**. 2013. 83 f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

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 hidroeletrolítica. 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 extra-cerebrais 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

CONDE, V. M. G. **Nitroergic modulation in the Oxytocinergic regulation of Atrial Natriuretic Peptide secretion in cardiomyocytes**. 2013. 83 f. Thesis (Ph.D.). Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

Oxytocin (OT) was recently shown to be involved in endocrine and neuroendocrine regulation through receptor-mediated actions exerted on the heart, vasculature, and kidney. Oxytocin is a neuropeptide synthesized primarily in magnocellular neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus, which project to posterior pituitary, median eminence, and several brain regions. Oxytocin is also produced in peripheral tissues, including the heart. In addition, nitric oxide (NO) may be generated constitutively within the heart. This work was performed to verify the role of oxytocin and nitroergic modulation on atrial natriuretic peptide (ANP) secretion in primary culture of mice embryo cardiac myocytes. Cardiomyocytes were isolated from Balb C mice embryo and cultivated by 3 days for obtain an optimal basal ANP secretion. After the exchange by a fresh medium containing OT (0.1, 1, 10 and 100 μM), a dose-dependent increase in ANP and nitrate release was observed, suggesting that OT may have a direct stimulatory action on cardiomyocytes and that action may be related to nitric oxide production. Blockage of 10 μM OT-induced ANP release were observed after addition of 100 μM Compound VI [d(CH₂)⁵, Tyr(Me)₂, Thr₄, Tyr-NH₂(9)]-Ornithin Vasotocin (CVI-OVT), a specific OT antagonist. This antagonist induced a decrease in ANP release when added alone (100 μM), suggesting that OT may act by a tonic inhibitory autocrine mechanism on ANP secretion. A amplification of OT-induced ANP release was observed after addition of 600 μM N(G) nitro-L-arginine methylester (L-NAME), a NO synthase inhibitor, and 100 μM 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), a soluble guanylate cyclase inhibitor, suggesting that a nitroergic negative feedback may act restraining the ANP release stimulated by OT.

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

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. Principais vias de controle neuroendócrino do balanço de sal e água no organismo.....	18
Figura 2. Representação esquemática do possível mecanismo de ação da ocitocina no cardiomiócito.....	20
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação de NO na célula cardíaca...	25
Figura 4. Cultivo de cardiomiócitos de embriões de camundongo.....	36
Esquema 1. Desenho experimental de incubação dos cardiomiócitos.....	37
Figura 5. Controle de qualidade do cultivo e sua preparação para o estudo.....	44
Figura 6. Perfil de secreção basal de ANP e nitrato.....	45
Figura 7. Efeitos da administração de KCl na liberação basal de ANP em cardiomiócitos.....	46
Figura 8. Efeitos da administração de ocitocina (OT) na liberação de ANP.....	47
Figura 9. Efeitos da administração de ocitocina (OT) na liberação de nitrato (NO ₃).....	48
Figura 10. Efeitos da administração individual de antagonista de OT na liberação de ANP.....	49
Figura 11. Efeitos da administração de CVI-OVT na liberação basal de ANP ou induzida por OT.....	50
Figura 12. Efeitos da administração de SNP, um doador de NO, na liberação de ANP basal ou estimulada por OT.....	51
Figura 13. Efeitos da administração de L-NAME, um inibidor inespecífico da NOS, na liberação de ANP basal ou estimulada por OT.....	52
Figura 14. Efeitos da administração de ODQ, um inibidor da CGs, na liberação de ANP basal ou estimulada por OT.....	53
Figura 15. Representação esquemática do mecanismo envolvendo a liberação de ANP e NO induzida por OT.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	enzima adenilato ciclase
ACHn	neurônio colinérgico
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ANGII	angiotensina II
ANP	peptídeo natriurético atrial
ANPn	neurônio anpérgico
AoBr	barorreceptor aórtico
AP	pituitária anterior
ATP	adenosina trifosfato
ATBr	barorreceptor atrial
AV3V	região antero-ventral do terceiro ventrículo
AVP	arginina vasopressina.
BH ₄	tetrabiopterina
BrR	barorreceptores
Ca ²⁺	cálcio
[Ca ²⁺] _i	concentração de cálcio intracelular
CaM	complexo Ca ²⁺ -Calmodulina
CG	enzima guanilato ciclase
CGs	enzima guanilato ciclase solúvel
CVI-OVT	VI [d(CH ₂) ₅ , Tyr(Me) ₂ , Thr ₄ , Tyr-NH ₂ (9)]-Ornitina Vasotocina
DAG	diacilglicerol
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
EVEC	expansão de volume extracelular
FAD	flavina adenina nucleotídeo
FMD	flavina mononucleotídeo
GC-A	receptor para peptídeo natriurético tipo A com atividade guanilato ciclase
GC-B	receptor para peptídeo natriurético tipo B com atividade guanilato ciclase

GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
HH	haste hipofisária
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	inositol trifosfato
LC	<i>locus coeruleus</i>
L-NAME	L-nitro arginina metil éster
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
5-HTn	neurônio serotoninérgico
NDR	núcleo dorsal da rafe
NEn	neurônio noradrenérgico
NH	neurohipófise
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NOS	óxido nítrico sintases
NOS1	óxido nítrico sintase neuronal
NOS2	óxido nítrico sintase induzível
NOS3	óxido nítrico sintase endotelial
NPBL	núcleo parabraquial lateral
NPR-A	receptor de peptídeo natriurético subtipo A
NPR-B	receptor de peptídeo natriurético subtipo B
NPR-C	receptor de peptídeo natriurético subtipo C
NPV	núcleo paraventricular
NSO	núcleo supraóptico
NTS	núcleo do trato solitário
O ₂	oxigênio
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OT	ocitocina
OTR	receptor de ocitocina
OTn	neurônio ocitocinérgico
PDEII	fosfodiesterase II
PBS	tampão fosfato

PIP ₂	fosfatidil inositol difosfato
PKA	proteína cinase A
PLC	fosfolipase C
PP	pituitária posterior
RS	retículo sarcoplasmático
RTS	reabsorção tubular de sódio
SERCA	bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
SNC	sistema nervoso central
SNP	nitroprussiato de sódio
TFG	taxa de filtração glomerular
TnI	troponina I

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	Vii
LISTA DE FIGURAS.	Viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	Ix
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 A ocitocina na homeostase do balanço cardiovascular e hidroeletrolítico.....	15
1.2 O óxido nítrico (NO).....	21
1.3 O NO na modulação da liberação de peptídeo natriurético atrial cardíaco.....	26
1.4 Regulação do ANP cardíaco.....	28
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais.....	35
3.2 Cultura de cardiomiócitos.....	35
3.3 Desenho Experimental.....	37
3.4 Quantificação de ANP.....	38
3.5 Dosagem de nitrato (NO ₃).....	39
3.6 Análise estatística.....	40
3.7 Planejamento experimental.....	41
4. RESULTADOS	42

5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ocitocina na homeostase do balanço cardiovascular e hidroeletrólítico

O coração é o principal órgão propulsor do sistema cardiovascular e essa propriedade aliada ao sistema condutor constituído por extensa rede de vasos sanguíneos garante a oferta de nutrientes às células e a subtração de resíduos remanescentes de seu metabolismo, que, em grande proporção precisam ser excretados do organismo (SAMBRANO et al., 2002)

A essa função eminentemente propulsora foi acrescentada uma função endócrina (De BOLD et al., 1981), conferida por sua habilidade em produzir e secretar para a circulação sistêmica o peptídeo natriurético atrial (ANP), um hormônio, como indica sua denominação, capaz de diminuir a pressão arterial por ação natriurética e diurética, resultante de sua ligação a receptores presentes no nefro (RUSKOAHO, 1992).

Assim, como todo órgão de controle do organismo, foi também relacionado a um órgão sensor, capaz de detectar mudanças na osmolalidade plasmática dependente ou não da concentração de sódio circulante. Nesse sentido, identifica-se muito o ANP com outro hormônio regulador do balanço hídrico e eletrolítico: a ocitocina (OT), a qual de forma similar age diminuindo a pressão arterial e a osmolalidade plasmática por aumentar a excreção renal de sódio (SOARES, et al., 1999). Este efeito pode ser amplificado como resultante de sua ação estimuladora da secreção de ANP no coração. Somam-se assim, efeitos de hormônios natriuréticos a partir de sinalizações disparadas por sensores periféricos (coração, orofaringe, pulmão, fígado, rins, etc.) e centrais (sistema hipotálamo-neurohipofisário, dentre outros). Do sistema neurohipofisário é secretada a ocitocina como ação neuroendócrina efetora a uma diversidade de processamentos neurais superiores.

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 hidroeletrolítica (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).

Pertencente à superfamília de receptores acoplados a proteína G, os receptores de ocitocina (OTR) estão associados tanto a proteína G tipo Gq/11 como a proteínas Gi (WETTSCHURECK et al., 2004; REVERSI et al., 2005), que podem ativar a fosfolipase C e a produção de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), a partir da clivagem de bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂). A elevação da concentração citoplasmática de IP₃ mobiliza o cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol. O DAG, por sua vez, ativa a proteína cinase C, a qual atua estimulando respostas celulares diversas, como influxo de Ca²⁺ para o citoplasma (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). Por outro lado, os receptores associados à proteína Gi promovem a inibição da enzima adenilato ciclase (AC), com a conseqüente redução dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), a abertura de canais de K⁺ e o fechamento de canais de Ca²⁺. Deste modo, receptores associados à Gi têm um caráter inibitório (REVERSI et al., 2005).

Os estímulos mais potentes para liberação de OT são: aumento de osmolalidade plasmática, pressão arterial e hipervolemia (KADEKARO et al., 1992).

Um modelo proposto por Antunes-Rodrigues (2004), para a regulação neurohumoral da secreção de OT, ANP e vasopressina (AVP) e seus efeitos no sistema cardiovascular e

hídroeletrolítico (Fig. 1), preconiza que a expansão hipertônica aguda do volume extracelular (EVEC) estimularia mecano-receptores sino-aórticos e renais, desencadeando sinalização aferente via neurônios glutamatérgicos do núcleo do trato solitário (NTS), neurônios noradrenérgicos (NEn) do *locus coeruleus* (LC) e/ou serotoninérgicos (5-HTn) do núcleo dorsal da rafe (NDR); por conexões colinérgicas (ACHn) ou adrenérgicas ao hipotálamo, estimulariam a secreção de ANP central, que, por sua vez, intermediaria a liberação de OT e AVP de neurônios dos núcleos paraventriculares e supra-ópticos para a circulação sistêmica, a constituir uma via neuroendócrina de regulação da secreção de ANP atrial, garantindo uma tríade regulatória destes hormônios sobre a excreção compensatória de água e eletrólitos visando a correção renal da osmolalidade e pressão sanguínea (HAANWINCKEL et al., 1995; SOARES et al., 1999; VENTURA et al., 2002; DURLO et al., 2004).

Desta forma, o aumento da osmolalidade poderia ser corrigido por ação preponderantemente natriurética da OT e diurética do ANP via aumento da síntese de NO e subsequente produção de GMPc. Soares et al., (1999), mostraram um efeito natriurético da OT por diminuição da reabsorção tubular de sódio dependente da formação de GMPc, que por sua vez, inibe o transporte acoplado de sódio da luz tubular, ao longo de seu segmento proximal. Vasodilatação da arteríola aferente, resultante à ação do ANP (BRENNER et al., 1990), causaria mais diurese por aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) e diminuição de reabsorção tubular de sódio (RTS), por ação da OT (SOARES et al., 1999), resultaria em normalização da pressão arterial e da osmolalidade plasmática, respectivamente.

A contribuição da AVP para a regulação do balanço de sódio e diluição do plasma seria aditiva à da OT e estaria relacionada à secreção de sódio do coletor mediada por AMPc. Estudos desenvolvidos em linhagem de células de duto coletor da zona medular interna mostraram que ambas, AVP e OT, produziram aumento da síntese de AMPc intracelular e da concentração extracelular de sódio (WARGENT et al., 1999).

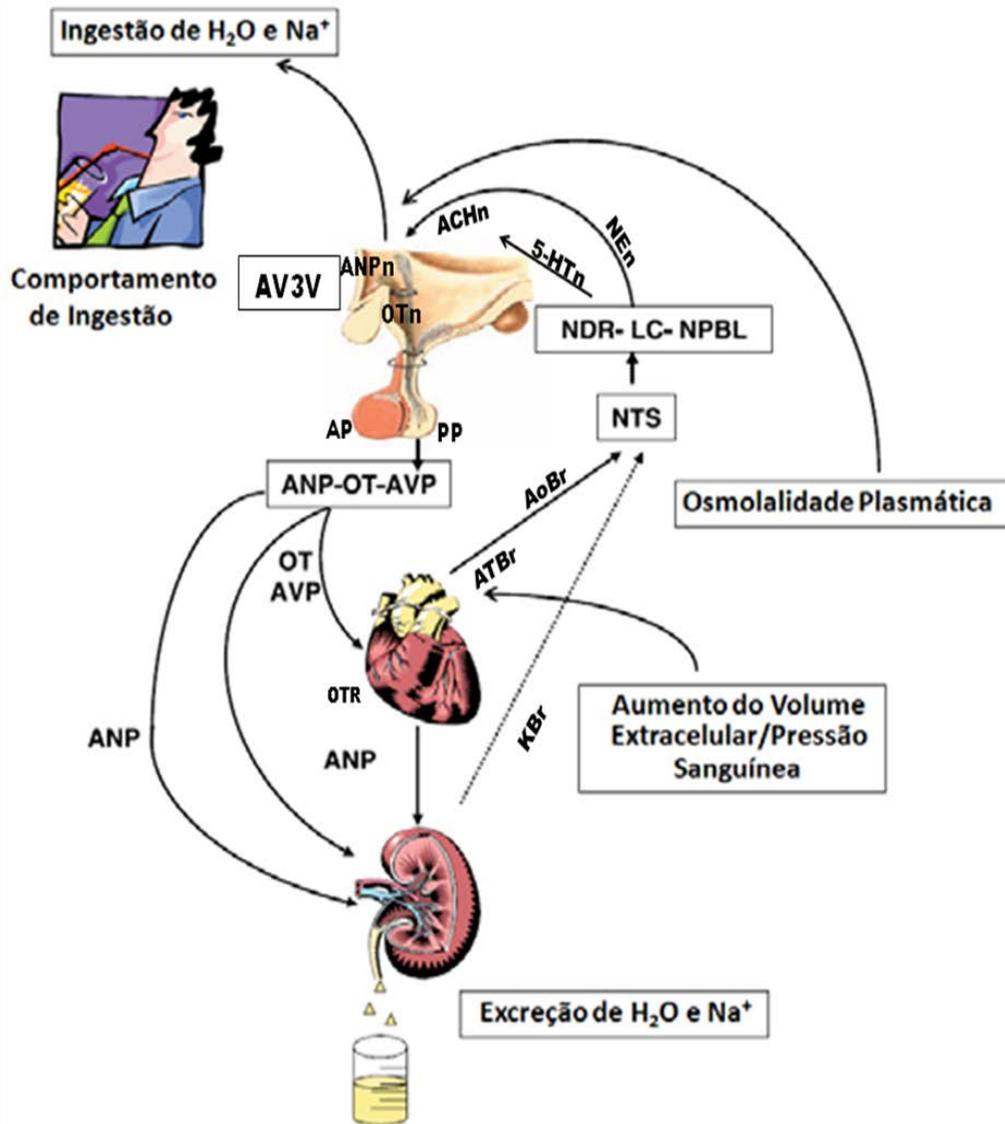


Figura 1. Principais vias de controle neuroendócrino do balanço de sal e água no organismo. Abreviações: (AoBr) Barorreceptores aórticos; (ATBr) Barorreceptores atrial; (KBr) Barorreceptores renais; (NEn) Neurônios norepinefrinérgicos; (DRN) Núcleo dorsal da rafe; (5-HTn) Neurônios serotoninérgicos; (LC) *Locus coeruleus*; (NTS) Núcleo da trato solitário; (ACHn) Neurônios colinérgicos; (ANPn) Neurônios ANPérgicos; (ONn) Neurônios ocitocinérgicos; (AP) Pituitária Anterior; (PP) Pituitária posterior; (OT) Ocitocina; (OTR) receptores de Ocitocina; (AVP) vasopressina; (ANP) Peptídeo natriurético atrial; (NPBL) Núcleo parabraquial lateral (Fonte: adaptado de Antunes-Rodrigues et al., 2004).

No coração, a OT estimula a liberação de ANP e diminui a força e a frequência de contração (FAVARETTO et al., 1997; MUKADDAM-DAHER et al., 2001), 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) (Figura 2). 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) (FRANSEN 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.

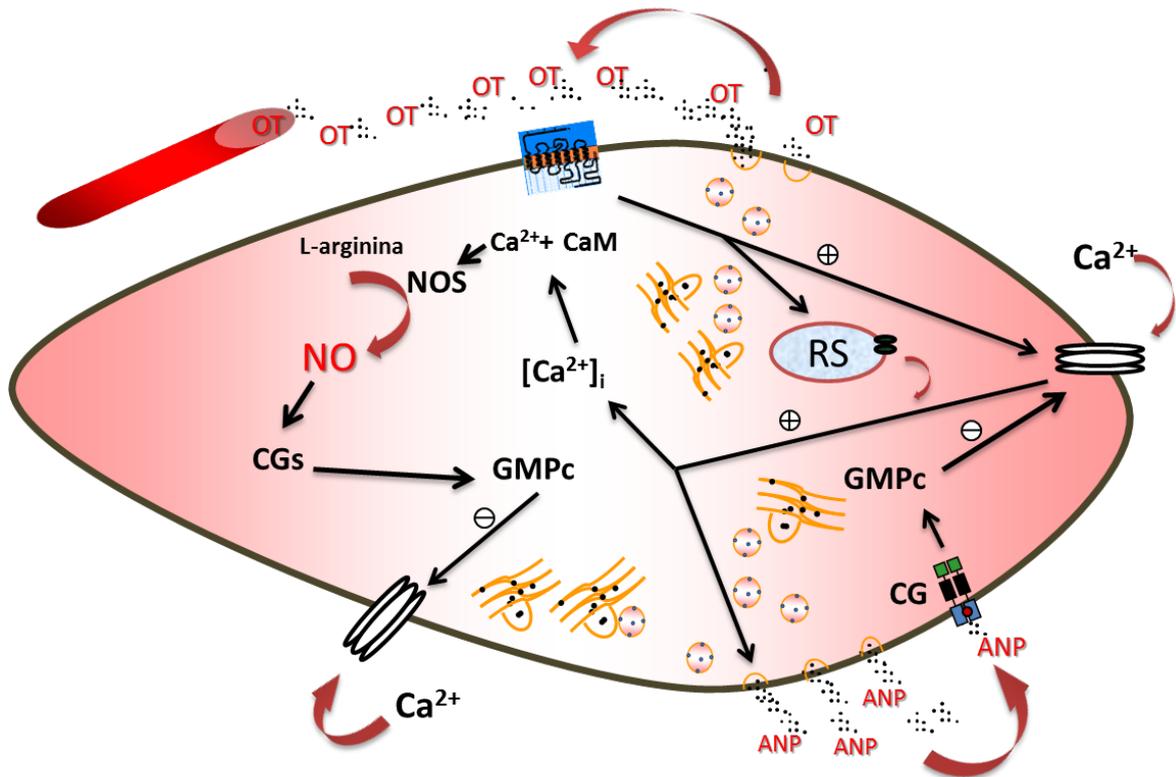


Figura 2. Representação esquemática do possível mecanismo de ação da ocitocina na síntese de NO e liberação de ANP no cardiomiócito. **OT** = ocitocina. **NO** = óxido nítrico. **ANP** = peptídeo natriurético atrial. **RS** = retículo sarcoplasmático. **NOS** = óxido nítrico sintase. **CaM**= calmodulina. **Ca²⁺**= cálcio. **CGs** = guanilato ciclase solúvel. **CG** = guanilato ciclase. **GMPc** = guanosina monofosfato cíclica. (+) estimulação. (-) = inibição.

1.2 O óxido nítrico (NO)

O NO foi descoberta originariamente na circulação quando análises experimentais demonstraram que, na ausência do endotélio, a vasodilatação induzida pela acetilcolina não ocorria. Naquele momento, Furchgott e Zawadzki (1980) documentaram que, quando estimulado, o endotélio era capaz de liberar uma substância vasoativa que foi denominada fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês endothelium-derived relaxing factor), o que podia ser explicado quantitativamente pela formação de NO pelas células endoteliais.

O NO é uma pequena molécula gasosa demasiadamente lábil, potencialmente tóxica em altas concentrações e altamente difusível, que pode ser sintetizada endogenamente através de uma família de enzimas conhecidas como NOS (WANG & MARSDEN, 1995), pertencentes à família das citocromo P450, a qual catalisa a oxidação sequencial do grupamento guanidina do aminoácido L-arginina produzindo quantidades equimolares de L-citrulina e NO (BUSH et al., 1992), num processo que envolve cinco elétrons e é dependente de oxigênio molecular (O₂) e NADPH, além de co-fatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrabiopterina (BH₄) (ALDERTON et al., 2001).

Existem três isoformas de NOS: duas são constitutivas, cuja atividade depende da presença do complexo Ca²⁺- Calmodulina (CaM), que são a isoforma 1 (neural ou nNOS) (BREDT et al., 1990; BREDT & SNYDER, 1994) e a isoforma 3 (endotelial ou eNOS) (POLLOCK et al., 1991); e uma isoforma tipo 2 (induzível ou iNOS) que é ativada em situações de estresse celular (MOILANEN & VAPAATALO.,1995). A denominação dessas enzimas baseou-se nos locais onde foram primeiramente clonadas e caracterizadas (COOKE & DZAU, 1997).

Na célula endotelial, a enzima NOS3 localiza-se na membrana celular e pode estar associada à caveolinas, em especial a caveolina-1 na célula endotelial. As caveolinas são

proteínas de ligação presentes nas cavéolas, que são invaginações da membrana celular onde se concentram receptores e grupos de enzimas, que por estarem localizados em proximidade uns aos outros, tornam a sinalização celular mais eficiente (FERON et al., 1996; SBAA et al., 2005). Uma vez ativada, a enzima NOS3 sintetiza o NO, que se difunde para a célula muscular lisa presente nos vasos sanguíneos.

No coração, a NOS3 encontra-se expressa principalmente no endotélio vascular coronariano e no endotélio cardíaco (SCHULZ et al., 1991), assim como nos cardiomiócitos (BALLIGAND et al., 1995). Nessas células, a NOS3 localiza-se nas cavéolas, ancorada pela caveolina 3 na membrana plasmática da célula cardíaca (FERON et al., 1996; BAROUCH et al., 2002), próxima aos canais de Ca^{+2} tipo L (KEMPF & WOLLERT., 2004). Sua expressão também foi detectada nos cardiomiócitos e nas células da musculatura lisa de pequenas e grandes artérias coronarianas de ratos (TAMBASCIA et al., 2000). Nessas células a NOS1 localiza-se no retículo sarcoplasmático, próximo aos receptores de rianodina (XU et al., 1999, BURKARD et al., 2007). O coração não expressa normalmente NOS2. Como mencionado anteriormente, esta isoforma é ativada em situações de estresse celular, como por mediadores do processo inflamatório em muitos tipos de células, incluindo células endoteliais e cardiomiócitos (ANDREW & MAYER, 1999). Pode ser identificada no citosol (KEMPF & WOLLERT, 2004), mas já foi encontrada no espaço perinuclear, complexo de Golgi, mitocôndria e membrana plasmática (XU et al., 2003).

O NO difunde-se livremente através de membranas celulares podendo agir como um fator parácrino por apresentar meia vida de curta duração, aproximadamente de 5 a 10 segundos. Como produtos de seu metabolismo os íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) são utilizados como indicadores indiretos de sua produção (MARLETTA, 1989, 1993).

Os estímulos mais importantes que controlam a síntese endotelial de NO em condições fisiológicas são provavelmente mecânicos, sendo importante o fluxo e as forças de

cisalhamento. Existem evidências de que o estresse de cisalhamento possa ativar os canais de cálcio da membrana da célula endotelial, e dessa maneira ativar a NOS3. No entanto, o relaxamento mediado pelo estresse de cisalhamento também pode ocorrer independente de alterações na concentração intracelular de cálcio (IGNARRO., 2002). Além disso, as células endoteliais possuem receptores para diversos vasodilatadores, incluindo acetilcolina, adenosina difosfato e bradicinina, cuja ocupação aumenta o cálcio intracelular e estimula a biossíntese endotelial de NO. Nas células cardíacas, o estímulo para a síntese de NO é provavelmente o estiramento dos miócitos, produzido após ativação das isoformas da NOS. Essa expansão dos miócitos causa aumento do influxo de Ca^{2+} mediado pela produção do NO (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004).

Na célula endotelial a via de transdução de sinal que leva à ativação da NOS3, no seu curso completo, começa com a estimulação de um receptor de membrana, que ativa uma proteína G acoplada à fosfolipase C. Esta enzima regula a via fosfatidilinositol gerando inositoltrifosfato (IP_3) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 media a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e o DAG media a entrada de cálcio extracelular. A elevação na concentração do cálcio intracelular leva à formação do complexo cálcio-calmodulina, que ativa a NOS3, resultando na produção de NO (VIARO et al., 2000).

O mecanismo de ação do NO na célula muscular lisa, deve-se principalmente à ativação da enzima guanilato ciclase (CG). Uma vez produzido pelo endotélio, o NO se difunde até a célula muscular dos vasos sanguíneos e liga-se à guanilato ciclase solúvel (CGs). No entanto, o NO não é capaz de ativar a CG associada aos receptores de membrana (FRIEBE & KOESLING, 2003).

A formação do NO em cardiomiócitos é altamente compartimentalizada (ZIOLO & BERS, 2003), como resultado da localização das NOS. Devido à alta reatividade natural do

NO, sua síntese na proximidade do seu alvo facilita sua acessibilidade aos processos intracelulares para uma sinalização mais coordenada (FLEMING & BUSSE, 1999). Há evidências de que o NO produzido pela NOS3 e NOS1 promove redução e aumento da contratilidade, respectivamente (BAROUCH et al., 2002; KHAN et al., 2003).

Os mecanismos de ação do NO na célula cardíaca são mediados pelo aumento da concentração da GMPc (Figura 2). O NO tem como alvo na célula cardíaca a enzima CGs. Uma vez ativada, a CGs catalisa a conversão de GTP em GMPc, que conseqüentemente 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, conseqüentemente 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.

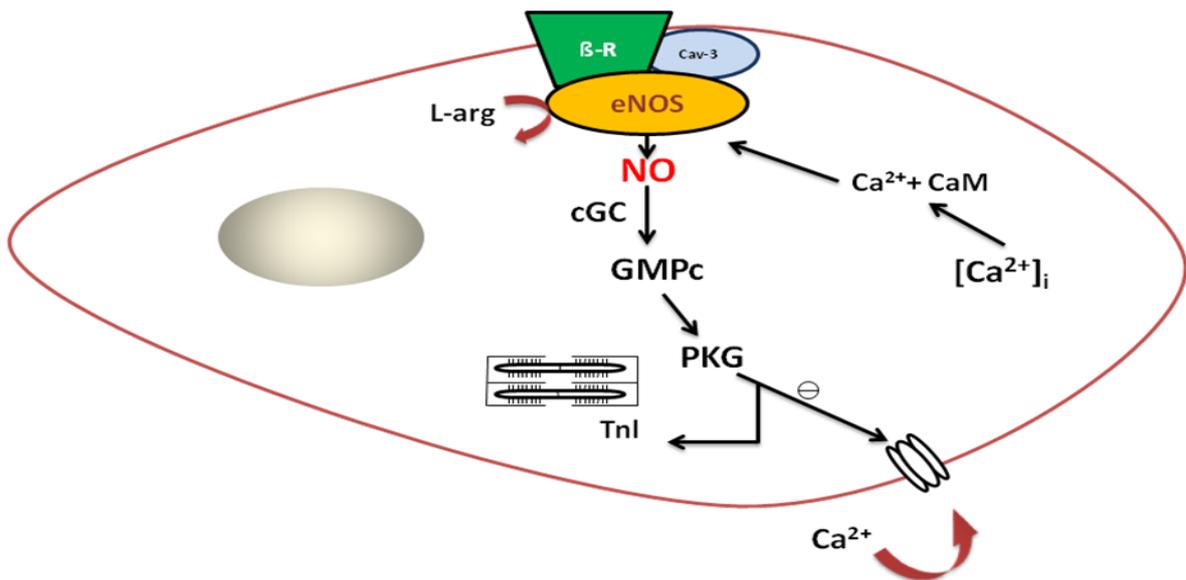


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação de NO na célula cardíaca. **β -R** = receptor β -adrenérgico. **Cav-3** = caveolina 3. **CaM**= calmodulina. **Ca²⁺**= cálcio. **eNOS** = óxido nítrico sintase endotelial. **L-ARG** = L-arginina. **NO** = óxido nítrico. **GCs**= guanilato ciclase solúvel. **G. GMPc** = guanosina monofosfato cíclica. **PKG** = proteína cinase G. **TnI** = troponina I. (-) = inibição.

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).

1.3 O óxido nítrico na modulação da liberação de ANP cardíaco

Vários autores relataram a presença de NOS em células cardíacas (BRADY et al., 1992, BALLIGAND et al., 1994, 1995; HAN et al., 1996; JOE et al., 1998; XU et al., 1999; BURKARD et al., 2007). Um estudo demonstrou que a inibição da síntese de NO por um inibidor competitivo L-NMMA em coração isolado de rato superou o efeito inibitório da acetilcolina sobre a liberação de ANP, demonstrando que a liberação de NO endotelial pode modular negativamente a secreção de ANP (MELO & SONNENBERG, 1996). Adicionalmente, o aumento de GMPc induzido por 8-bromo-GMPc ou nitroprussiato de sódio (SNP) diminui a secreção de ANP *in vitro* usando coração de ratos perfundidos (RUSKOAHO et al, 1986) ou cultura de miócitos atriais (LIDA & PAGE, 1988). Estudos mostraram que o NO inibiu a expressão atrial de RNAm para ANP (LEE et al., 2000).

Além disso, o NO pode atuar também como mensageiro intermediário na ação inibitória da acetilcolina sobre a secreção de ANP em co-cultura de endotélio aórtico bovino e miócitos atriais de ratos neonatos (LEW & BAERTSCHI, 1989). Por outro lado, a inibição de NO com azul de metileno aumenta a secreção de ANP em átrios isolados de ratos (SANCHEZ-FERRER et al., 1990). Contudo, em ratos não anestesiados, a infusão do L-NAME, inibidor da sintase do NO, aumenta a secreção de ANP em resposta à expansão do volume sanguíneo, sugerindo que NO possa atuar como um inibidor tônico da secreção de ANP *in vivo* (LESKINEN et al., 1995).

Outras evidências demonstram 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 a adição de doadores de NO (WAHLER & DOLLINGER, 1995; FLESCHE et al., 1997). No entanto, apesar do mecanismo celular pelo qual NO inibe a secreção de ANP ainda careça de elucidação, parece este depender da síntese de GMPc (DIETZ, 2005).

1.4 Regulação do ANP cardíaco

O ANP é um polipeptídeo de 28 aminoácidos, parte integrante de uma família de hormônios cíclicos cardiovasculares cuja característica estrutural principal é a presença de uma seqüência de 17 aminoácidos formando um anel preso por pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteína, responsável por sua atividade biológica (para revisão: GUTKOWSKA & NEMER, 1989; RUSKOAHO, 1992; ESPINER et al., 1995; YANDLE, 1994; De BOLD et al., 1996; PANDEY, 2011).

A concentração do ANP é maior no átrio direito que no esquerdo sendo bem menor no ventrículo (RUSKOAHO,1992). O ANP circulante (com 28 aminoácidos) é rapidamente degradado a um peptídeo inativo por ação de endopeptidases neutras (OLINS et al., 1989). A molécula sofre hidrólise e pode ser clivada na posição Cys¹⁰⁵ - Phe¹⁰⁶ o que provoca a abertura do círculo de 17 aminoácidos, resultando em sua inativação (YANDLE,1994).

Diversas ações biológicas do ANP resultam de interações específicas com receptores de alta afinidade acoplados a guanilato ciclase (CG), tendo como segundo mensageiro o GMPc (PANDEY, 2005a; PANDEY, 2011). O ANP atua na membrana celular através de três tipos de receptores (NPR-A/GC-A, NPR-B/GC-B e NPR-C/GC-C) (KOLLER & GODDEL, 1992, PANDEY, 2005b). Os receptores NPR-A e NPR-B, mas não o NPR-C, têm um domínio intracelular ligado a CG que gera GMPc a partir de GTP, que por sua vez ativa PKG. O NPR-C atua como um receptor de depuração do ANP plasmático, como resultado desta ativação também pode ocorrer inibição da enzima adenilil ciclase (PALAPARTI et al., 2000; ANAND-SRIVASTAVA, 2005).

Vários são os estímulos que ativam e conseqüentemente regulam a secreção de ANP: hipervolemia, ingestão de sódio, hipóxia e os fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio (RUSKOAHO, 1992; De BOLD et al.,1996; DIETZ, 2005). Dentre estes, o

estímulo mais importante para a liberação de ANP é o estiramento da parede atrial (FERRARI & AGNOLETTI, 1989).

Em células cardíacas as vias de transdução de sinal ativadas por estiramento atrial é caracterizada pela ativação de vários sistemas de segundo mensageiro (SADOSHIMA & IZUMO, 1997). Vários estudos demonstram a importância do Ca^{2+} citosólico como um possível mensageiro intracelular mediando à secreção de ANP ativada por estiramento.

Vários trabalhos mostraram modulação positiva de Ca^{2+} celular na secreção de ANP ativada por estiramento (LAINE et al., 1994, 1996). Além disso, a secreção de ANP também é conhecida por ser dependente de diversos neurotransmissores e agentes humorais, os quais induzem a hidrólise de fosfoinosítídeos e a formação de IP_3 , o que leva a mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (RUSKOAHO, 1992).

Os nucleotídeos cíclicos atuam como importantes mensageiros na liberação de muitos hormônios e em vários casos o AMPc e GMPc têm efeitos opostos. No entanto, para a secreção de ANP, ambos AMPc e GMPc são inibitórios. Forscolina, que aumenta AMPc intracelular, inibe a secreção de ANP em miócitos atriais (MUIR et al., 1993) e em corações isolados perfundidos de ratos (RUSKOAHO et al., 1990). A secreção de ANP dependente de estiramento também pode ser inibida por 8-chloro-phenylthio-cAMP e cafeína em átrios de ratos (PAGE et al., 1990), como também pelo pré-tratamento de isoprenalina em átrios de ratos (AGNOLETTI et al., 1992), sugerindo que AMPc pode ser um modulador negativo da secreção de ANP.

Além disso, vários fatores humorais parecem inibir a secreção de ANP através da estimulação de AMPc, incluindo adrenomedulina (SATO et al., 1997), β -adrenérgicos, como isoproterenol (MUIR et al., 1993), histamina (LI et al., 2003) e inibidores da fosfodiesterase-III (CUI et al., 2002).

O GMPc regula preponderantemente de forma inibitória o metabolismo celular por interferir negativamente em sinalizações estimuladoras cuja resultante é o aumento do íon cálcio livre no citoplasma (DOMEK-LOPACINSKA & STROSZNAJDER., 2005). 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). Além disso, o GMPc pode inibir a contratilidade cardíaca via ativação da enzima guanilato ciclase, diminuindo os níveis de cálcio livre no sarcoplasma, através de 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.

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).

Curiosamente, o coração é capaz de sintetizar e liberar OT em condições de aumento do estiramento atrial (JANKOWSKI et al., 1998). Portanto, não somente a OT circulante pode atuar induzindo a liberação de ANP no coração, mas também a OT cardíaca, sugerindo um papel autócrino para a OT cardíaca (JANKOWSKI et al, 1998; GUTKOWSKA et al., 2000; PETERSSON et al, 2002).

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 (FAVARETTO et al., 1997, JANKOWSKI et al., 1998, 2000 e 2001).

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.

2. OBJETIVOS

GERAL:

Estudar possíveis mecanismos nitrérgicos relacionados à regulação da secreção de ANP por ocitocina em cultivo primário de cardiomiócitos de embriões de camundongos.

ESPECÍFICOS:

- Estudar efeitos de diferentes concentrações de OT (0.1, 1, 10 ou 100 μM) sobre a liberação de ANP e nitrato;

- Estudar efeitos de diferentes concentrações de um antagonista de receptores de OT (CVI-OVT 0.1, 1 e 10 μM) sobre a liberação de ANP basal ou estimulada por OT;

- Estudar efeitos da adição de um doador para a síntese de NO (SNP 600 μM) sobre a secreção de ANP basal ou estimulada por OT (10 μM);

- Estudar efeitos da adição de um bloqueador da síntese de NO (L-NAME 600 μM) sobre a secreção de ANP basal ou estimulada por OT (10 μM);

- Estudar efeitos da adição de um bloqueador da síntese de GMPc (ODQ 100 μM) sobre a secreção de ANP basal ou estimulada por OT (10 μM).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste trabalho 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*.

3.2 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 cultivos de cardiomiócitos quando observados ao microscópio de contraste de fase apresentaram células formando um sincício (Figura 4).

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 Ca^{2+} e Mg^{2+} , 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.

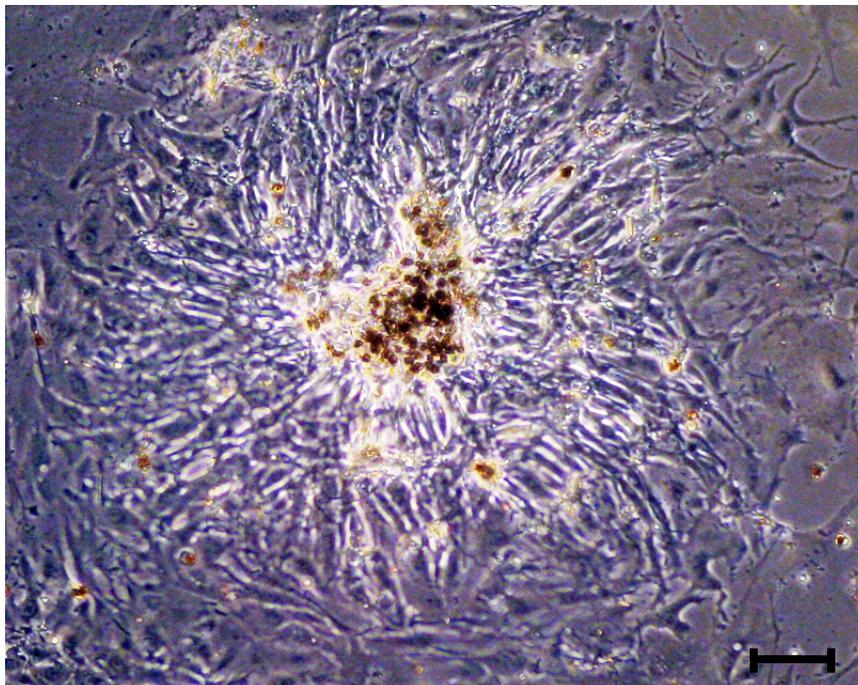
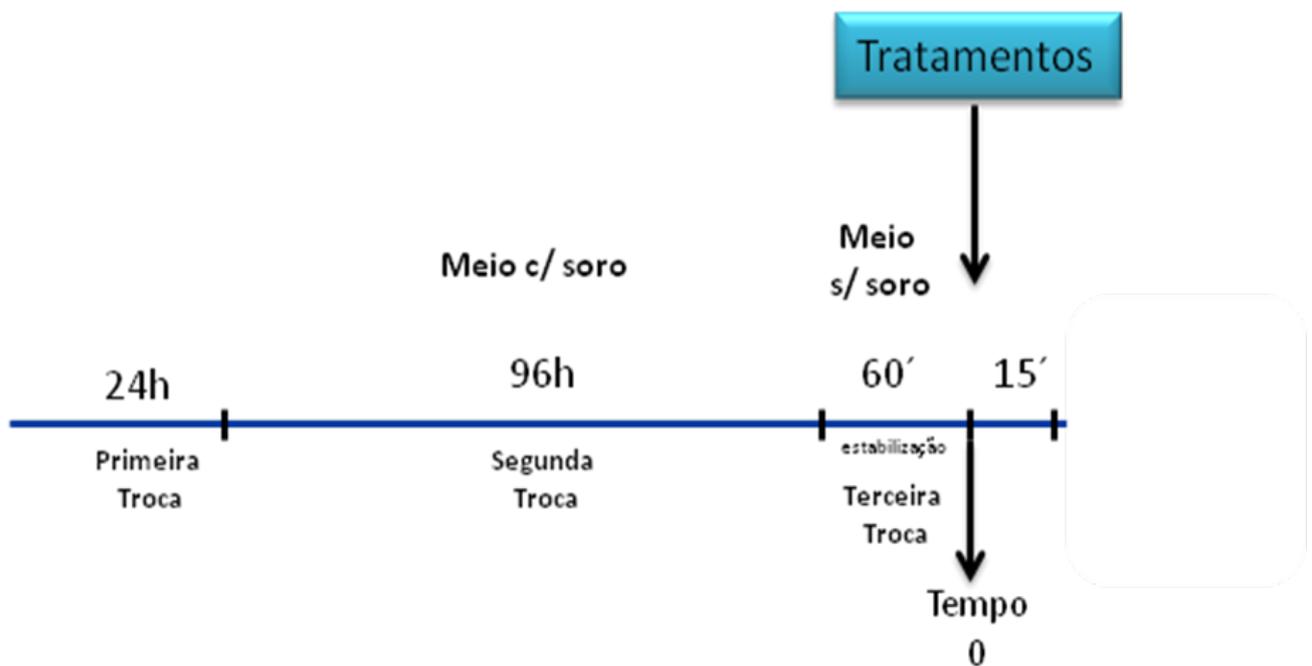


Figura 4. Cultivo de cardiomiócitos de embriões de camundongo observados em microscópio de contraste de fase. Barra de Escala 100µm

3.3 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 seqüência 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 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para quantificação de ANP e nitrato, de acordo com esquema experimental abaixo:



Esquema 1. Desenho experimental de incubação dos cardiomiócitos. Foram cultivados com meio de crescimento (DMEM) por 96 horas. Depois desse tempo, incubados por 60 minutos com meio sem soro. Em seguida, mais 15 min para o ensaio com substâncias testes.

3.4 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- Península[®]), 100µl de tampão ANP [Na₂HPO₄ 7 H₂O – monosfosfato 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.

3.5 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 µl 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 NOAnalysisTM 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.

3.6 Análise estatística

Os resultados são apresentados com média \pm 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.

3.7 Planejamento Experimental

- **Experimento I:** Efeitos da administração de diferentes concentrações de OT (0.1, 1, 10 e 100 μM), na liberação de ANP e nitrato.

- **Experimento II:** Efeitos da administração de diferentes concentrações de um antagonista dos receptores de OT, CVI-OVT (0.1, 1 e 10 μM), na liberação de ANP.

- **Experimento III:** Efeitos da administração de antagonista dos receptores de OT, OVT-CVI (100 μM) na liberação de ANP induzida por OT.

- **Experimento IV:** Efeitos da administração de doador para a síntese de NO, SNP (600 μM), na secreção de ANP basal ou induzida por OT (10 μM).

- **Experimento V:** Efeitos da administração de bloqueador da síntese de NO, L-NAME (600 μM), na liberação de ANP basal ou estimulada por OT (10 μM).

- **Experimento VI:** Efeitos da administração de bloqueador da síntese de GMPc, ODQ (100 μM), na liberação de ANP basal ou estimulada por OT (10 μM).

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da secreção de ANP e Nitrato

Para a padronização da secreção de nitrato as substâncias foram administradas após a troca de meio no dia seguinte do cultivo e 50 µl de meio era coletado diariamente para dosagem de nitrato. Observou-se que a produção constitutiva de nitrato pelo cardiomiócito em cultura é baixa, daí a dificuldade para fragmentação de coleta em tempos curtos. A figura 5 mostra a evolução da concentração de nitrato ao longo de 120 horas de observação na condição basal ou estimulada a partir de coletas diárias de amostras. O aumento progressivo da concentração de nitrato mostra um perfil cumulativo, o que corresponde com a relativa estabilidade metabólica desta substância no meio.

Para mostrar a responsividade dos cardiomiócitos na liberação de nitrato com relação ao tempo foi administrado isoproterenol, um agonista dos receptores β -adrenérgicos. O tratamento com isoproterenol na dose de 10^{-7} M, mostrou efeitos mais significativos nos últimos dois dias de observação com uma potente elevação da concentração do metabólito nitrérgico após 120 horas de observação (Figura 5). Estes efeitos serviram para demarcar o período ideal de crescimento e responsividade dos cardiomiócitos.

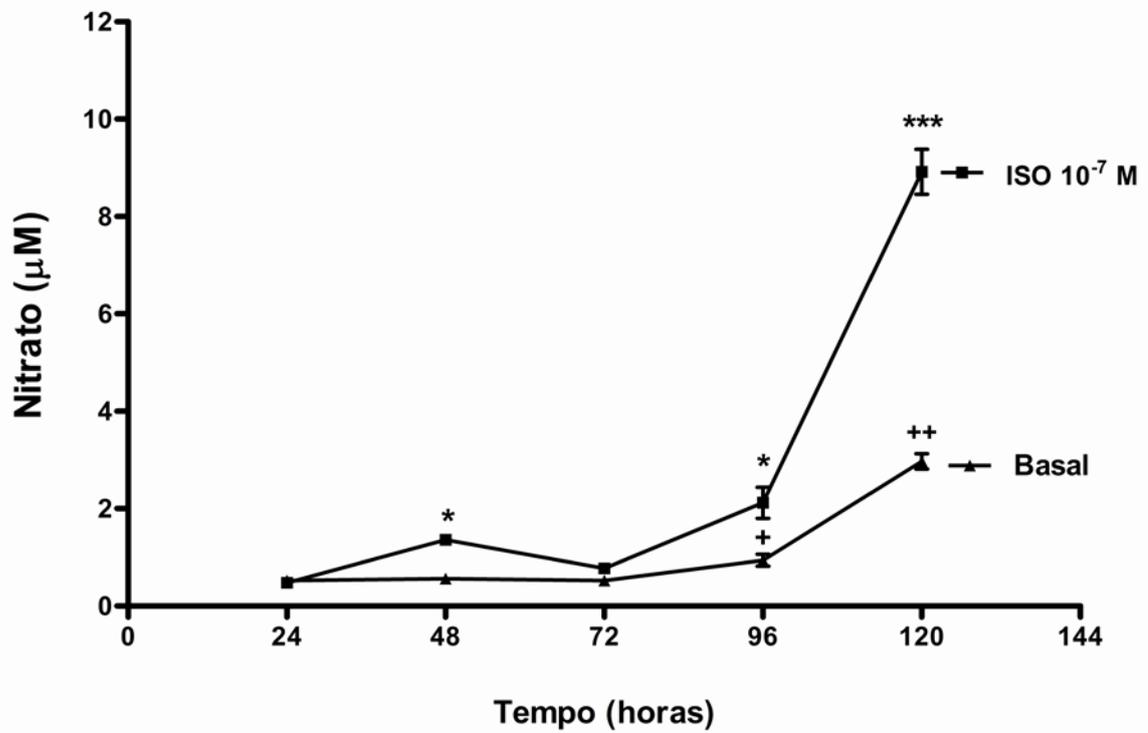


Figura 5. Controle de qualidade do cultivo e sua preparação para o estudo. Responsividade adrenérgica após a adição de isoproterenol (10^{-7} M) mostrando recuperação de sistemas de sinalização de membrana após dissociação enzimática das células. Os valores são apresentados como média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para comparações entre tratado *versus* basal no mesmo grupo de células. + $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ para comparações entre diferentes grupos.

Para a padronização da secreção basal de ANP, a solução nutriente DMEM enriquecida, foi substituída após 96 h de cultivo. Em seguida procedeu-se uma pré-incubação por 60 min com o objetivo de se medir a produção basal da secreção de ANP e nitrato em curto período e para se comparar com a sua secreção após a substituição de meio sem soro. O meio sem soro foi usado para se retirar a influência destas substâncias e de outros fatores sinalizadores ali contidos. Coletas de 300 μ l após 5, 15, 60 min com reposição de igual volume de meio. Foi adotado o tempo de 15 min para as coletas dos períodos de teste, pois o tratamento com a OT foi mais eficiente em aumentar a liberação de ANP aos 15 min de observação. O tempo de 5 min foi eliminado por apresentar baixos valores secretores. A figura 5 mostra que as concentrações de ANP e nitrato estão estáveis e reproduzem a estimativa do acumulado de cada intervalo de tempo.

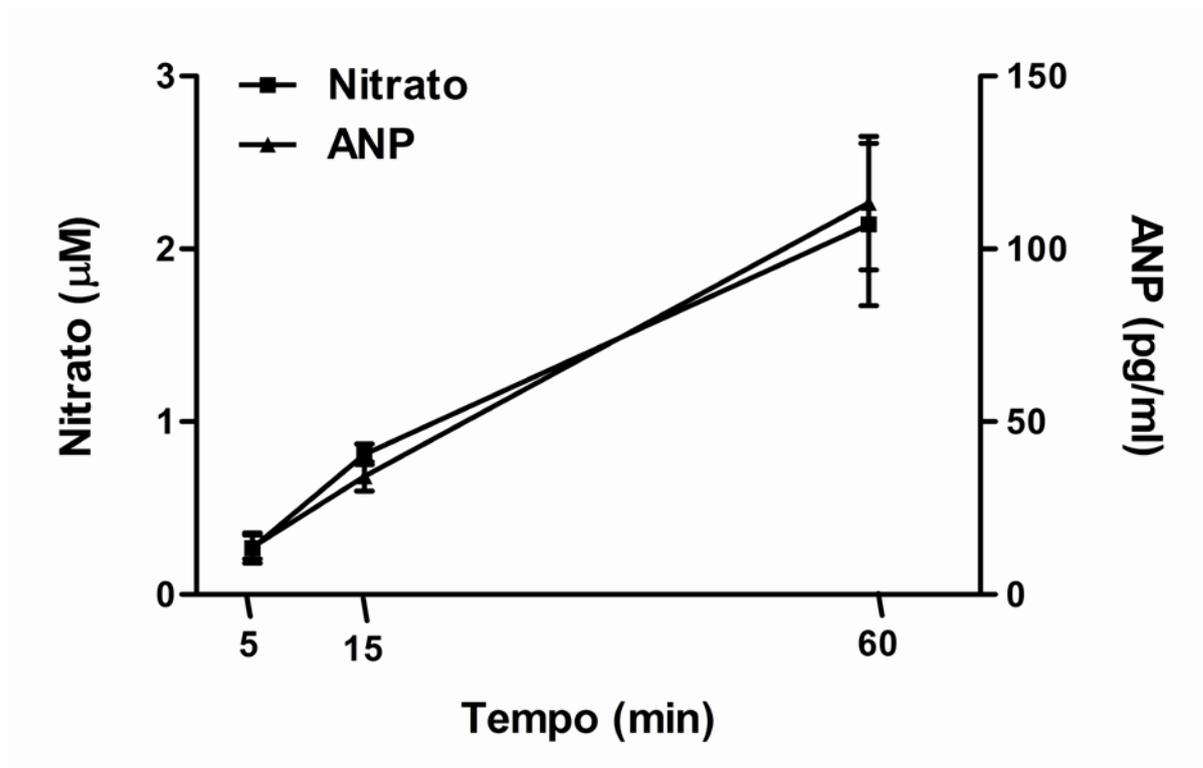


Figura 6. Perfil de secreção basal de ANP e nitrato com meio sem soro nos intervalos (5,15 e 60 min). Os valores são apresentados como média \pm EPM (n=6) das concentrações de ANP e nitrato acumulado no meio.

Para avaliar a função dos cardiomiócitos no intervalo de 15 min com meio sem soro adicionamos KCl (56 mM), para examinar o efeito da despolarização da célula. Verificou-se que a administração de KCl (56mM) foi suficiente para produzir aumento da concentração de ANP (Figura 7), demonstrando integridade funcional da célula.

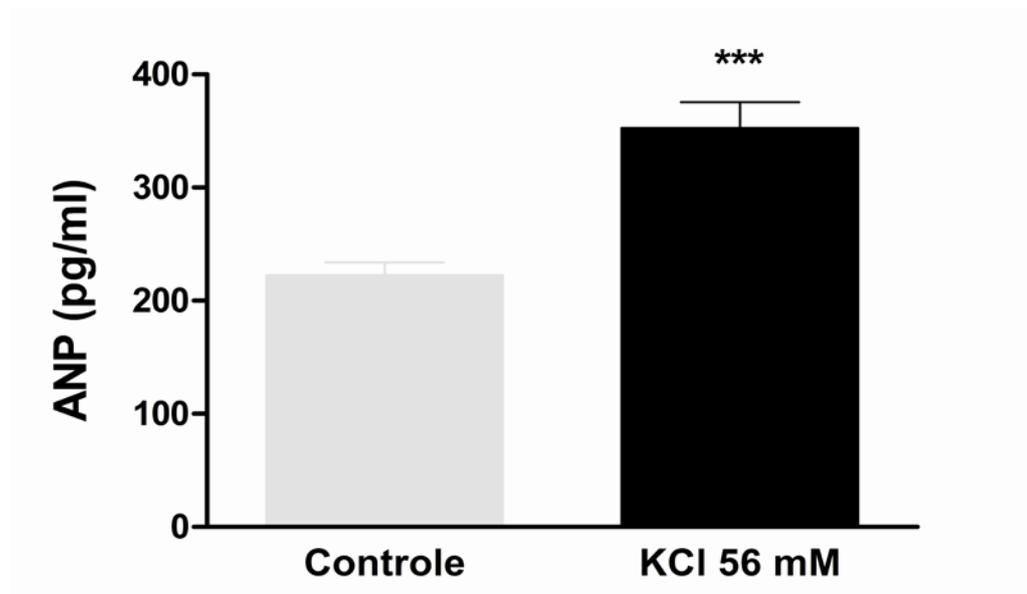


Figura 7. Efeitos da administração de KCl (56 mM) na liberação basal de ANP em cultivo primário de cardiomiócitos acumulado no meio sem soro após 15 min de observação. Os valores são apresentados como média±EPM (n=6). *** $p < 0,001$ para comparações entre tratado *versus* basal no mesmo grupo de células.

EXPERIMENTO I:

4.2. Efeitos da ocitocina sobre a concentração 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 μ M) na liberação de ANP para o meio (Figura 8). Os efeitos de OT na liberação do ANP começou 5 min após a adição das doses de 10 e 100 μ M, 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 9).

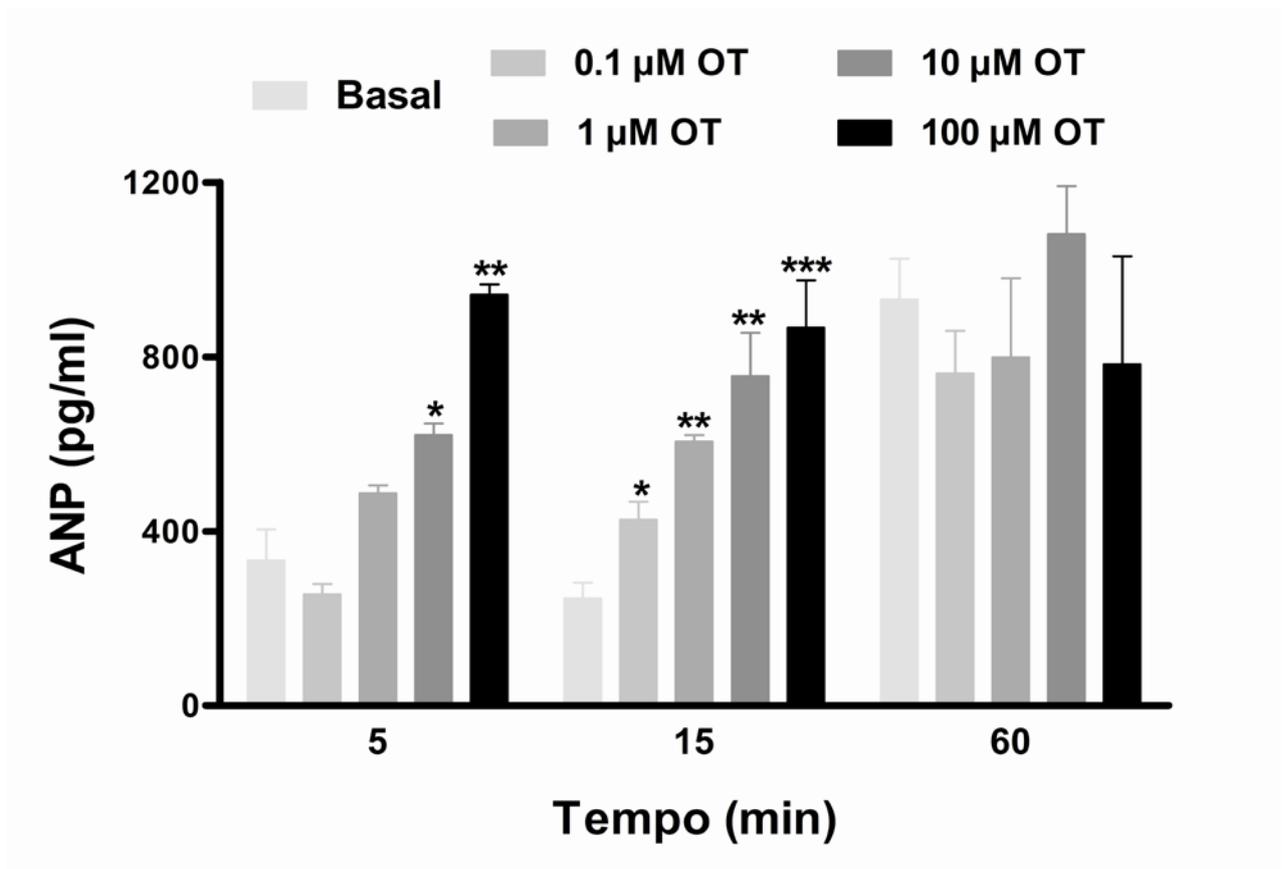


Figura 8. Efeitos da administração de ocitocina (OT) na liberação de ANP (n=6). Os valores são apresentados em média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para comparações entre tratado *versus* basal no mesmo grupo de células.

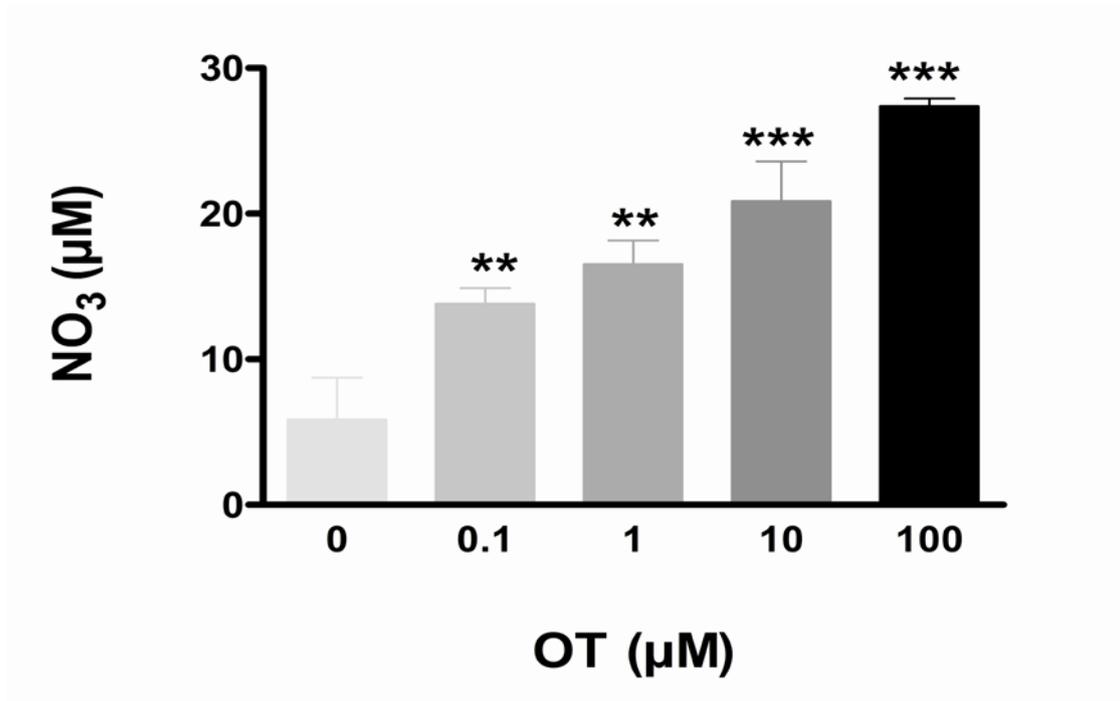


Figura 9. Efeitos da administração de ocitocina (OT) na liberação de nitrato (NO₃) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média±EPM. ((n=6) * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 para comparações entre tratado *versus* basal no mesmo grupo de células.

EXPERIMENTO II:

4.3. Efeitos do bloqueio de receptores de OT sobre a secreção basal de ANP

Com o objetivo de verificarmos 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 10), sugerindo um efeito limitado por contínua e baixa liberação de OT constitutiva para o meio.

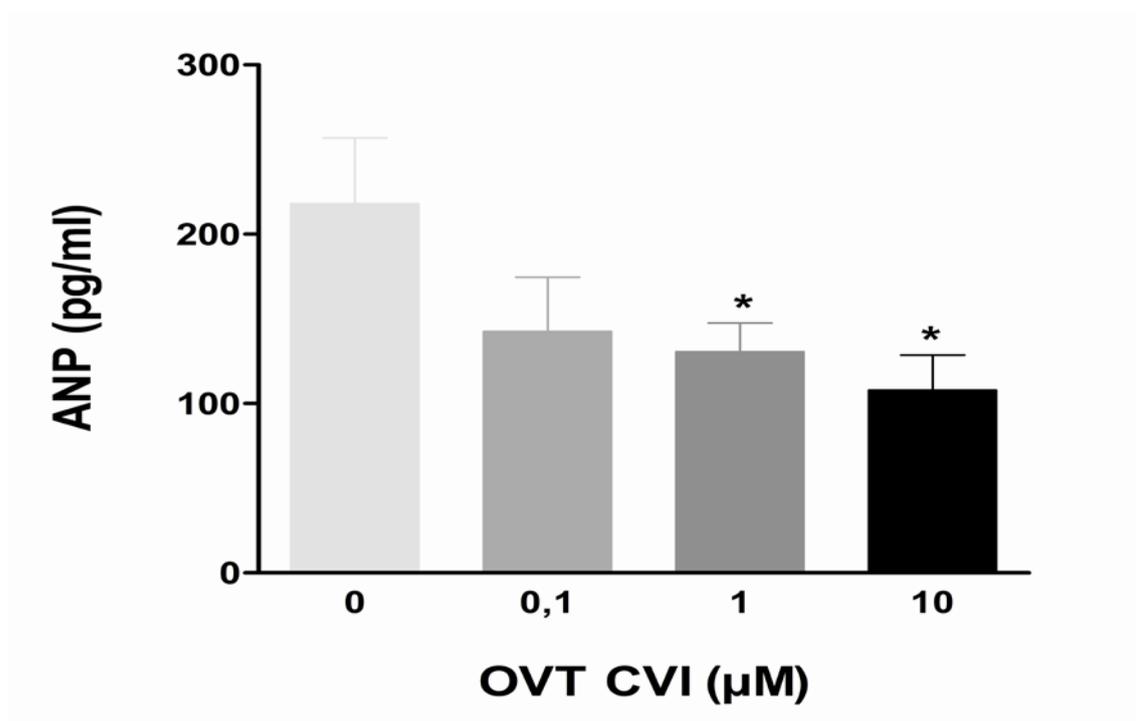


Figura 10. Efeitos da administração individual de antagonista de OT na liberação de ANP basal após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM.* $p<0,05$; ** $p<0,01$ para comparações entre tratado *versus* controle.

EXPERIMENTO III:

4.4. 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 μ M. Quando associado com OT foi demonstrado o bloqueio (CVI-OVT 100 μ M) da estimulação ocitocinérgica sobre a liberação de ANP (Figura 11). Esta substância foi eficaz em inibir a liberação de ANP induzida por OT (10 μ M). Comprovando a especificidade dos efeitos de OT.

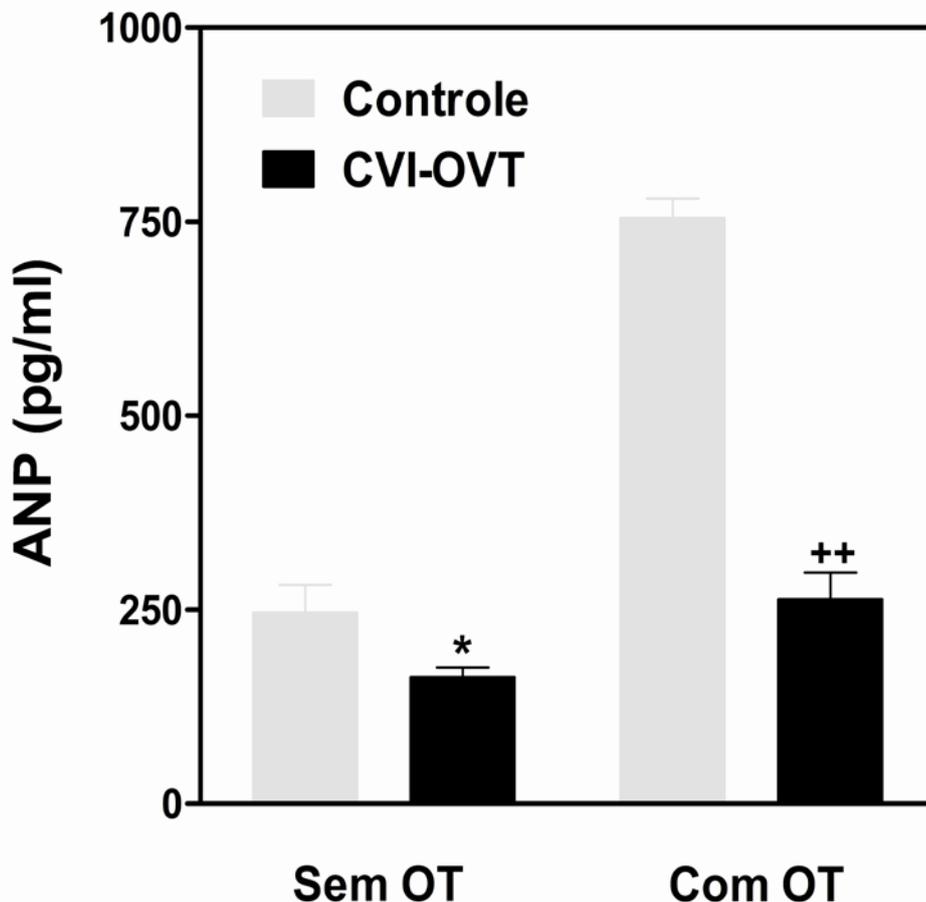


Figura 11. Efeitos da administração de CVI-OVT (100 μ M) na liberação basal de ANP (sem OT) ou induzido por OT (com OT) em condições de equimolaridade (10 μ M) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ para comparações entre tratado *versus* controle. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ para comparações entre grupos tratados *versus* respectivos controles.

EXPERIMENTO IV:**4.5. Efeitos de doador de NO sobre a secreção de ANP basal ou induzida por ocitocina**

Com o objetivo de estudar 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 12).

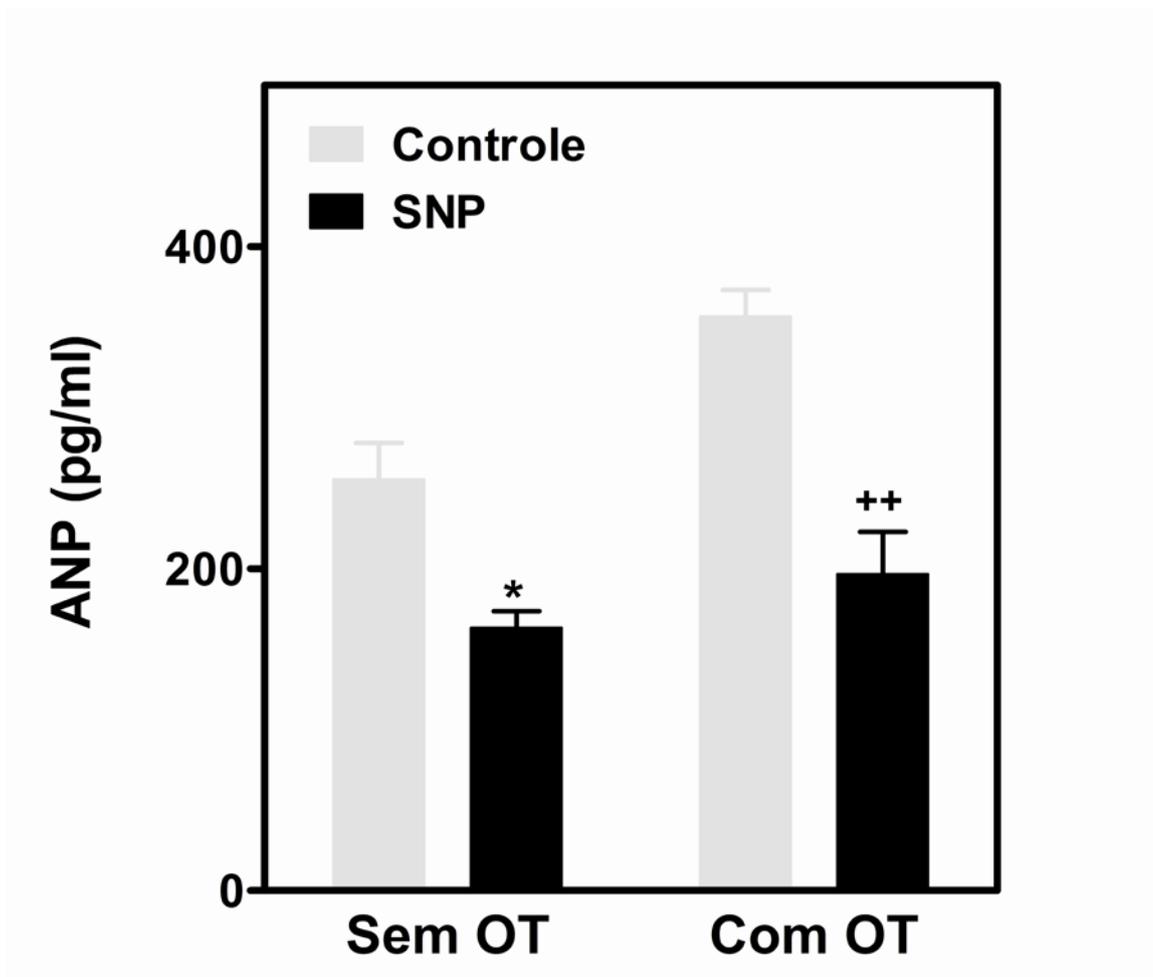


Figura 12. Efeitos da administração de SNP (600 μ M) na liberação de ANP basal (sem OT) ou estimulada por OT (10 μ M) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM (n=6). p *<0,05; ** p<0,01 para comparações entre tratado *versus* controle. + p<0,05; ++ p<0,01 para comparações entre grupos tratados *versus* respectivos controles.

EXPERIMENTO V:**4.6. Efeitos de Inibidor da síntese do NO sobre a secreção de ANP basal ou induzida por ocitocina**

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 13).

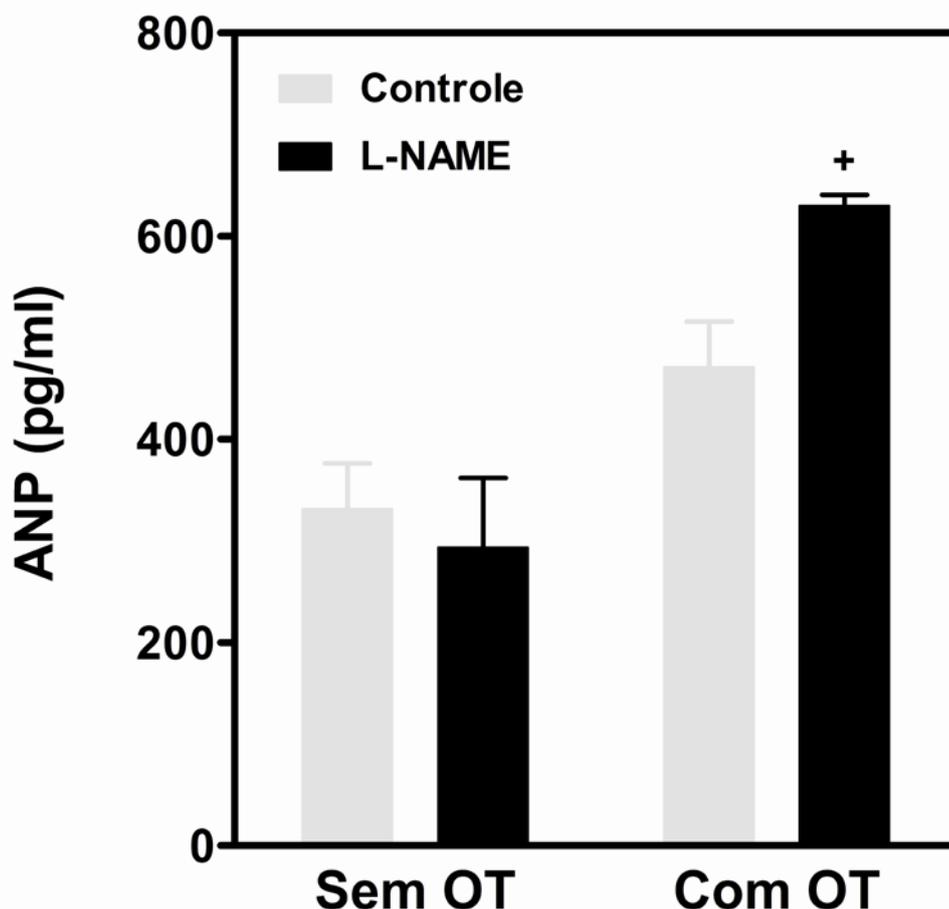


Figura 13. Efeitos da administração de L-NAME (600 μ M), um inibidor inespecífico da NOS, na liberação de ANP basal (sem OT) ou estimulada por OT (10 μ M) (com OT) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM (n=6). + p<0,05; ++ p<0,01 para comparações entre grupos tratados *versus* respectivos controles.

EXPERIMENTO VI:**4.7. Efeitos de um inibidor da síntese de GMPc sobre a secreção de ANP basal ou induzida por ocitocina**

Com o objetivo de avaliar a participação de GMPc na modulação nitrérgica da secreção de ANP basal ou estimulada por OT (10 μ M) adicionou-se 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 14).

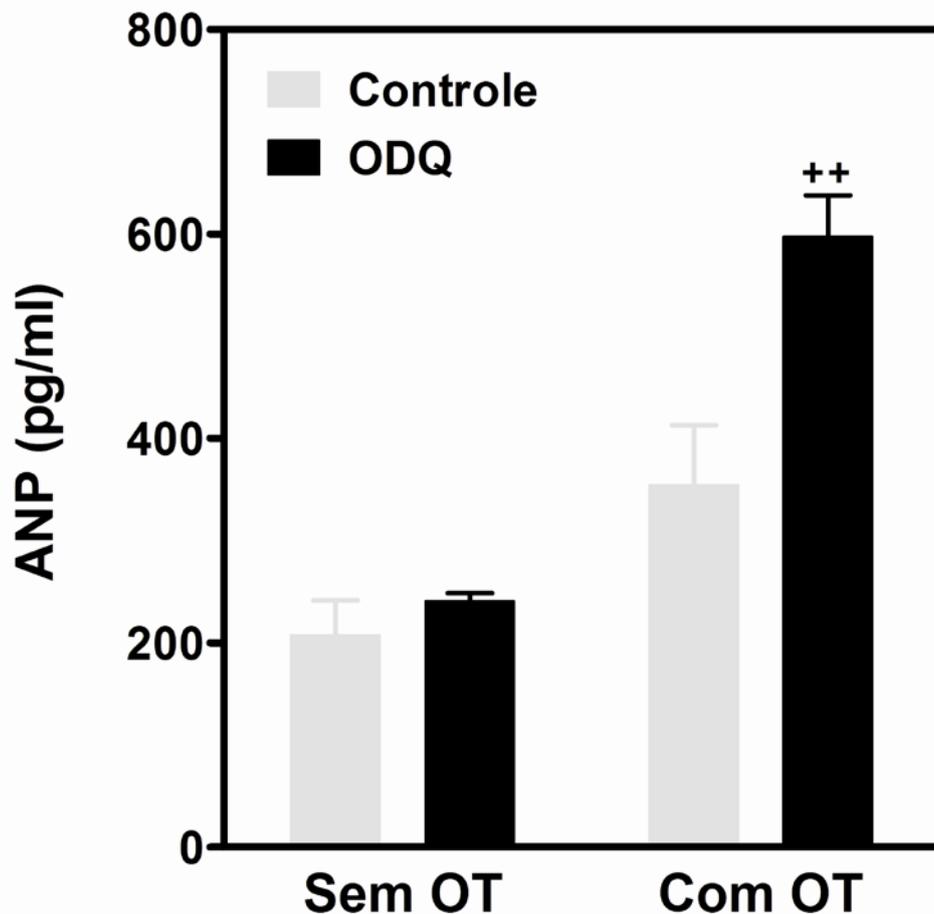


Figura 14. Efeitos da administração de ODQ (100 μ M), um inibidor da CGs, na liberação de ANP basal (sem OT) ou estimulada por OT (10 μ M) após 15 min de tratamento. Os valores são apresentados em média \pm EPM (n=6). + p < 0,05; ++ p < 0,01 para comparações entre grupos tratados *versus* respectivos controles.

5. DISCUSSÃO

Os resultados confirmaram, em cardiomiócitos isolados, a ação estimulatória da OT na secreção de ANP (Figura 8), 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 10). 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 9). 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 13) e, em contraste, o uso de um doador (SNP) inibiu tanto a secreção basal como a estimulada (Figura 12), 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 13) ou ODQ (Figura 14) 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 inotrópico 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 deveu-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 a 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).

No entanto, 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.

Em resumo, nosso estudo mostrou 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 (um mecanismo esquemático é proposto na Figura 15).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo nos levou as seguintes conclusões:

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 (evidenciado por medida de nitrato) 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNOLETTI, G., RODELLA, A., CORNACCHIARI, A., PANZALI, A.F., HARRIS, P., FERRARI, R. Isoproterenol induces release of atrial natriuretic peptide from rat atrium in vitro. **Am J Physiol.**, v., p. 262:H285-H292, 1992.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C.E. AND KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem.**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Natriuretic peptide receptor – C signaling and regulation. **Peptides**, v. 26, p. 1044-1059, 2005.
- ANDREW, P.J., MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res.**, v. 43 n. 3, p. 521-31, 1999.
- 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.
- BABU, B. R., GRIFFITH O. W. Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. **Current Opinion in Chemical Biology**; v. 2, p. 491-500, 1998.
- BALDINI, P.M., INCERPI, S., ZANNETTI, A., DE VITO. P., LULY, P. Selective activation by natriuretic factor of phosphatidylcholine-specific phospholipases activities in purified heart muscle plasma membrane. **J Mol Cell Cardiol**; v. 26, p. 1691–700, 1994.
- 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., UNGUREANEU-LONGROIS, D., SIMMONS, W.W., PIMENTAL, D., MALINSKI, T.A., KAPTUREZAK, M., TAHA, Z., LOWENSTEIN, C.J., DAVIDOFF, A.J., KELLY, R.A., SMITH, T.W., MICHEL, T. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 44, p. 27580-27588, 1994.

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.

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.

BAXTER, J. D.; LEWICKI, J. A.; GARDNER, D. G. Atrial natriuretic peptide. **Biotechnology.**, v.6, p529-546, 1988.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C1424-37, 1996.

BERNSTEIN, R. D., OCHOA, F. Y.; XU, X., FORFIA, P., SHEN, W., THOMPSON, C. I., & HINTZE, T. H. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. **Circ Res.**, v.79, p.840–848, 1996.

- BRADY, A.J., POOLE-WILSON, P.A., HARDING, S.E., WARREN, J.B. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. **Am. J. Physiol**, v. 263, n. 6 Pt 2, p. H1963-H1966, 1992.
- BREDT, D.S. AND SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu. Rev. Biochem.**, v.63, p175-195, 1994.
- BREDT, D.S., HWANG, P.M., SNYDER, H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature.**, v. 347, p. 768-770, 1990.
- BRENNER, B.M., BALLERMANN, B.J., GUNNING, M.E, ZEIDEL, M.L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. **Physiol Rev**, 70(3): 665-699, 1990.
- BRUTSAERT, D. L. Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. **Physiol Rev.**, v. 83, p. 59–115, 2003.
- BURKARD, N., ROKITA, A.G., KAUFMANN, S.G., HALLHUBER, M., WU, R., HU, K., HOFMANN, U., BONZ, A., FRANTZ, S., CARTWRIGHT, E.J., NEYSES, L., MAIER, L.S., MAIER, S.K., RENNÉ, T., SCHUH, K., RITTER, O. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. **Circ. Res.**, v. 100, n. 3, p. e32-e44, 2007.
- BUSH, P.A., GONZALES, N.E., GRISCAVAGE, J.M., IGNARRO, L.J. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 185, p. 960-966, 1992.
- 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.

- COOKE J P & DZAU V J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Annu. Rev. Med.**, v.48, p.489-509, 1997.
- CHO, H.J., XIE, Q., CALAYCAY, J., MUMFORD, R.A., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., NATHAN, C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 599-604, 1992.
- 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.
- CUI, X., WEN, J.F., JIN, H., LI, D., JIN, J.Y., KIM, S.H., KIM, S.Z., LEE, H.S., CHO, K.W. Subtype-specific roles of cAMP phosphodiesterases in regulation of atrial natriuretic peptide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 451 n. 3, p. 295-302. 2002.
- D'SOUZA, S. P., DAVIS, M., BAXTER, G. F. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, p. 113-129, 2004.
- DE BOLD, A., BORENSTEIN, H. B., VERESS, A. T., SONNENBERG, H., A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci.**, v. 28, p. 89-94, 1981
- DE BOLD, A. J. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. **Can J. Physiol Pharmacol.**, v.60, p.324, 1981.
- DE BOLD, A.J., BRUNEAU, B.G., DE-BOLD, M.L.K. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. **Cardiovascular Research**, v.31, p.7-18, 1996.
- DE WARDENER, H. E., CLARKSON, E. M. Concept of natriuretic hormone. **American Physiological Society.**, v. 65, p. 658-759, 1985.
- DIETZ, J. R. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. **Cardiovascular Research.**, v. 68, p. 8-17, 2005

- DOMEK-LOPACINSKA, K., STROSZNAJDER, J. B. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. **Journal of Physiol And Pharmacol.**, v. 56, p. 15-34, 2005.
- DURLO, F.V., CASTRO, M., ELIAS, L.L., ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. **Exp Physiol.**, v. 89, n. 5, p. 541- 548, 2004.
- 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.
- FERRARI, R. AND AGNOLETTI, G. Atrial natriurétic peptide: its mechanism of release from the atrium. **International Journal of cardiology.**, v. 24, p.137-149, 1989.
- FERON, O., BELHASSEN, L., KOBZIK, L., SMITH, T.W., KELLY, R.A., MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 22810-22814, 1996.
- FLEMING, I., BUSSE, R. NO: the primary EDRF. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 31, p. 5-14, 1999.
- FORSSMANN, W.G., RICHTER, R., MEYER, M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatina system. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 110, p. 335-357, 1998.
- FRANSEN, U., BANGSBO, J., SANDER, M., HOFFNER, L., BETAK, A., SALTIN, B., HELLSTEN, Y. Exercise-induced hyperaemia and leg oxygen uptake are not altered during effective inhibition of nitric oxide synthase with NG-nitro-L-arginine methyl ester in humans. **J Physiol.**, v. 531, p. 257-264, 2001.
- FLESCH, M. et al. Acute effects of nitric oxide and cyclic GMP on human myocardial contractility. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, n. 3, p. 1340-1349, 1997.

- FRIEBE, A. & KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ. Res.**, v. 93, n. 2, p. 96-105, 2003.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
- GALLO, M.P., GHIGO, D., BOSIA, A., ALLOATTI, G., COSTAMAGNA, C., PENNA, C., LEVI, R. C. Modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium current by nitric oxide synthase inhibitors. **J Physiol.**, v. 506, n. 3, p. 639-651, 1998.
- GEENEN, V., LEGROS, J. J., FRANCHIMONT, P., BAUDRIHAYE, M., DEFRESNE, M.P., BONIVER, J. The neuroendocrine thymus: coexistence of oxytocin and neurophysin in the human thymus. **Science.**, v. 232, p. 508-511, 1986.
- GEWALTIG, M.T. & KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. **Cardiovasc. Research.**, v. 55, p. 250-60, 2002.
- GIMPL, G., FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. **Physiological Reviews**, v.81, n.2, p.629-683, 2001.
- GOVERS, R., RABELINK, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 280, p. 193-206, 2001.
- GUTKOWSKA J, JANKOWSKI M. Oxytocin revisited: Its role in cardiovascular regulation. **Journal of Neuroendocrinology.**, v. 24, p.559-608, 2012.
- GUTKOWSKA, J. AND NEMER MONA. Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues. **Endocrine Reviews.**, v.10, n.4, p.519-536, 1989.
- GUTKOWSKA, J. Radioimmunoassay for atrial natriuretic factor. **Nucleotide Medical Biology.**, v.14. p.323-331, 1987.

GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S.M. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. **Physiological Reviews.**, v.77, n.2, p.465-515, 1997.

GUTKOWSKA, J., JANKOWSKI, M., LAMBERT, C., MUKADDAM-DAHER, S., ZINGG, H.H., MCCANN, S.M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.94, p.11704-11709, 1997.

GUTKOWSKA, J., JANKOWSKI, M., MUKADDAM-DAHER, S., MCCANN, S.M. Oxytocin is a cardiovascular hormone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.625-633, 2000.

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., KOBZIK, L., BALLIGAND, J.L., KELLY, R.A., SMITH, T.W. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. **Circ. Res.**, v. 78, n. 6, p. 998- 1008, 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.
- HU, A., CHIAMVIMONVAT, N., YAMAGISHI, T., MARBAN, E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. **Circ. Res.**, v. 81, n. 5, p. 742-752, 1997.
- JAMIESON, J., AND PALADE, G. E. Specific granules in atrial muscle cells. **J. Cell. Biol.**, v.25, p.151-172, 1964.
- 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.
- JANKOWSKI, M., WANG, D., HAJJAR, F., MUKADDAM-DAHER, S., McCANN, S.M., GUTKOWSKA, J. Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.97, n.11, p.6207-6211, 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.
- JOE, E.K., SCHUSSHEIM, A.E., LONGROIS, D., MÄKI, T., KELLY, R.A., SMITH, T.W., 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.
- 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.
- KEMPF, T., WOLLERT, K, C. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. **Bioessays.** v. 6, p.608-15, 2004.
- KHAN, S. A., SKAF, M.W., HARRISON, RW., LEE, K., MINHAS, K.M., KUMAR, A., FRADLEY, M., SHOUKAS, A. A., BERKOWITZ, D.E., HARE, J.M. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. **Circ Res.**, v. 92, p. 1322-1329, 2003.
- KIMURA, T., TANIZAWA O., MORI K., BROWNSTEIN, M & OKAYAMA, H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. **Nature.**, v 356, p. 526-529, 1992.
- KLIMASCHEWSKI, L., KUMMER, W., MAYER, B., COURAUD. J. Y., PREISLER, U., PHILIPPIN, B., HEYM, C. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. **Circ Res.** v. 71, p.1533-7, 1992.
- KOLLER KJ, GOEDEL DV. Molecular biology of natriuretic peptides and their receptors. **Circulation.**, v.86, p. 1081– 1088, 1992.
- 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.
- LAINÉ M., ARJAMAA O., VUOLTEENAHO O., RUSKOAHO H & WECKSTRÖMM. Block of stretch-activated atrial natriuretic peptide secretion by gadolinium in isolated rat atrium. **J Physiol (Lond).**, v. 480.3, p. 553-561, 1994.

- LAINEN M., ID L., VUOLTEENAHO O., RUSKOAHO H & WECKSTRÖM M. Role of calcium in stretch induced release and mRNA synthesis of natriuretic peptides in isolated rat atrium. **Pflugers Arch.**, v. 432, p. 953-960, 1996.
- LAYLAND, J., LI, J.M., SHAH, A. M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. **J Physiol.**, v. 540, p. 457-467, 2002.
- LEE, J.; LEE, S. H.; KANG, D. G. AND KIM, S. W. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the atrial natriuretic peptide system. **Pharmacological Research.**, v. 42, n.3, 2000.
- LEFEBVRE, D.L., LARIVIERE, R., ZINGG, H.H. Rat amnion: a novel site of oxytocin production. **Biol Reprod.**, v. 48, p. 632-639, 1993.
- 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.
- LEW, R. A.; BAERTSCHI, A. J. Endothelial cells stimulate ANF secretion from atrial myocytes in coculture. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.163, p.701-709, 1989.
- LI, D., WEN, J.F., JIN, J.Y., JIN, H., ANN, H.S., KIM, S.Z., KIM, S.H., LEE, H.S., CHO, K.W. Histamine inhibits atrial myocytic ANP release via H2 receptor-cAMP-protein kinase signaling. **Am J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, n. 2, p. R380-393. 2003
- LIDA, H., PAGE, E. Inhibition of atrial natriuretic peptide secretion by forskolin in noncontracting cultured atrial myocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 157, p. 330-6, 1988.
- 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.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. **TIBS.** V. 14, p. 488- 492, 1989.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry.**, v.268, n.17, p.12231-12234, 1993.
- 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.
- MELO, L.G., SONNENBERG H. Effect of nitric oxide inhibition on secretion of atrial natriuretic factor in isolated rat heart. **Am J Physiol.**, v. 270, p. H306-H311, 1996.
- 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.
- MICHELINI , L. C., MARCELO, M. C., AMICO, J., MORRIS, M. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 284, p. H2269–H2276, 2003.
- MOILANEN, E. & VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, v. 27, n. 3, p. 359-367, 1995.
- MUIR, T. M., HAIR, J., INGLIS G.C., DOW, J.W., LINDOP, G.B.M., LECKIE, B.J. Hormonal control of atrial natriuretic peptide synthesis and secretion from cultured atrial myocytes. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 25, p. 509-518, 1993.
- 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.

- OLINS, G.M., KRIETER, P.A., TRAPANI, A.J., SPEAR, K.L., BOVY, P.R. Specific inhibitors of endopeptidase 24.11 inhibit the metabolism of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 61, p. 201-208, 1989.
- ONDREJCAKOVA, M., RAVINGEROVA, T. PANCZA, D., JEZOVA, D. Oxytocin exerts protective effects on in vitro myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 87, n. 2, p. 137-42, 2009.
- PAGE, E., GOINGS, G.E., POWER, B., UPSHAW-EARLEY, J. Basal and stretch-augmented natriuretic peptide secretion by quiescent rat atria. **Am J Physiol.**, v. 259, p. C801-C818, 1990.
- PALAPARTI, A., LI, Y., ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A 10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. **Biochem. J.**, v. 346 p, 313-320, 2000.
- PANDEY, K. N. Biology of natriuretic peptides and their receptors. Peptides., Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A. **Peptides.**, v.26 n.6 p, 901-932, 2005b.
- PANDEY, K. N. Guanylyl cyclase/Atrial natriuretic peptide receptor-A: Role in the pathophysiology of cardiovascular regulation., **Can J. Physiol Pharmacol.**, v.9 n. 8 p, 557-573, 2011.
- PANDEY, K. N. Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A. **Peptides.**, v. 26, p. 985–1000, 2005a.
- 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.

- PETTY, M.A., LANG, R.E., UNGER, T., GANTEN, D. The cardiovascular effects of oxytocin in conscious male rats. **European Journal of Pharmacology.**, v.112, p.203-210, 1985.
- POLLOCK, J.S., FÖRSTERMANN, U., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., SCHMIDT, H.H., NAKANE, M., MURAD, F. Purification and characterization of particulate endotheliumderived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U SA.**, v. 88, n. 23, p. 10480-10484, 1991.
- 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
- REVERSI, A., RIMOLDI, V., MARROCCO, T., CASSONI, P., BUSSOLATI, G., PARENTI, M., CHINI, B. The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a biased agonist mechanism. **J Biol Chem.**, v. 280, p. 16311-16318, 2005.
- ROZEN, F., RUSSO, C., BANVILLE, D., ZINGG, H. H. Structure, characterization and expression of the rat oxytocin receptor gene. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p 200-204, 1995
- RUSKOAHO, H., VUOLTEENAHO, O., LEPPÄLUOTO, J. Phorbol esters enhance stretch-induced atrial natriuretic peptide secretion. **Endocrinology.**, v. 127, p. 2445-2455, 1990.
- RUSKOAHO, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. **Pharmacological Reviews.**, v.44, n.4, p.479-602, 1992.
- RUSKOAHO, H., TOTH, G.D., UNGER, T., LANG, R.E. The phorbol ester induced atrial natriuretic peptide secretion is stimulated by forskolin and Bay K8644 and inhibited by 8-bromo-cyclic GMP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.139, n. 1, p.266-74, 1986.
- SADOSHIMA, J., IZUMO, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu Rev Physiol.**, v. 59, p. 551-571, 1997.

- SAMBRANO, G. R., FRASER, I., HAN, H., NI, Y., O'CONNELL, T., YAN, Z., STULL, J. T. Navigating the signaling network in mouse cardiac myocytes. **Nature.**, v. 420, p. 712-714, 2002.
- SANCHEZ-FERRER C.F., BURNETT J.C. JR., LORENZ R.R., VANHOUTTE P.M. Possible modulation of release of atrial natriuretic factor by endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol.**, v. 259, p. H982-H986, 1990.
- 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.
- SASE, K., MICHEL, T. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Trends Cardiovasc Med.**, v. 7, p. 28-37, 1997.
- SBAA, E., FRERART, F., FERON, O. The double regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolae and caveolin: a paradox solved through the study of angiogenesis. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 15, n. 5, p. 157-162, 2005.
- SCHULZ, R., SMITH, J.A., LEWIS, M.J., MONCADA, S. Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. **Br J Pharmacol.**, v. 104, p. 21-4, 1991.
- 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.
- SILBERBACH M., ROBERTS CT. Natriuretic peptide signalling. Molecular and cellular pathways to growth regulation. **Cell Signal**, v.13, p.221–31, 2001.
- SHAH, A. M. et al. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ 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-ARAUJO, 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.

STOECKEL, M.E., FREUND-MERCIER, M.J., PALACIOS, J.M., RICHARD, P., PORTE, A. Autoradiographic localization of binding sites for oxytocin and vasopressin in the rat kidney. **J. Endocrinol.**, v. 113, p. 179- 182, 1987.

STUEHR, D., POU, S., ROSEN, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 14533-6, 2001.

SWANSON, L.W., KUYPERS, H.G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J Comp Neurol.**, v. 194, p. 555-570, 1980.

TAMBASCIA, R.C., FONSECA, P.M., CORAT, P.D.C., MORENO, H., SAAD, M.J.A., FRANCHINI, K.G. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II infused rats. **Hypertension.**, v. 37, p.1423-8, 2000.

TOHSE, N., NAKAYA H, TAKEDA Y, KANNO, M. Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca²⁺ channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. **Br J Pharmacol**, v. 114, p. 1076-1082, 1995.

TRIBOLLET, E., BARBERIS, C., JARD, S., DUBOIS-DAUPHIN, M., DREIFUSS, J.J. Localization and pharmacological characterization of high affinity binding sites for vasopressin and oxytocin in the rat brain by light microscopic autoradiography. **Brain Res.**, v. 23;442, n. 1, p. 105–118. 1988.

- THIBONNIER, M., CONARTY, D. M., PRESTON, J. A., PLESNICHER, C. L., DWEIK, R. A., ERZURUM, S. C. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. **Endocrinology**, v. 140, p. 1301–1309, 1999.
- VENTURA, R.R., GOMES, D.A., REIS, W.L., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M., VALENÇA, M.M., CARNIO, E.C., RETTORI, V., McCANN, ANTUNES-RODRIGUES, J. Nitregic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1101- 1109, 2002.
- VERBALIS, J. G., The brain oxytocin receptor(s)? **Front Neuroendocrinol.**, v. 20 p. 146-156, 1999.
- VIARO, F., NOBRE, F., EVORA, P.R.B. Expressão das óxido nítrico sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol.**, v. 74, n.3, p.365-379, 2000.
- WANG, D., GUTKOWSKA, J., MARCINKIEWICZ, M., RACHELSKA, G., JANKOWSKI, M. Genistein supplementation stimulates the oxytocin system in the aorta of ovariectomized rats. **Cardiovasc Res.**, v. 57, p. 186-94, 2003.
- 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.
- WANG, Y. AND MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. **Adv Pharmacol.**, v.34, p.71-90, 1995.
- WARGENT, E. T., BURGESS, W. J., LAYCOCK, J. F. & BALMENT, R. J. Separate receptors mediate oxytocin and vasopressin stimulation of cAMP in rat inner medullary collecting duct cells. **Exp. Physiol.**, v. 84, p. 17-25, 1999.
- WETTSCHURECK, N., MOERS, A., HAMALAINEN, T., LEMBERGER, T., SCHUTZ, G., OFFERMANN, S. Heterotrimeric G proteins of the Gq/11 family are crucial for the induction of maternal behavior in mice. **Mol Cell Biol.**, v. 24 n. 18, p. 8048-8054, 2004.

- XU, K.Y., HUSO, D.L., DAWSON, T.M., BREDT, D.S., BECKER, L.C. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 2, p. 657-662, 1999.
- XU, K.Y., KUPPUSAMY, S.P., WANG, J.Q., LI, H.; CUI, H., DAWSON, T.M., HUANG, P. L., BURNETT, A.L., KUPPUSAMY, P., BECKER, L.C. Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. **J Biol Chem.**, v. 278 n. 43, p. 41798-803, 2003.
- YANDLE, T. G. Biochemistry of natriuretic peptides. **Journal of Internal Medicine** v.235, p.561-576, 1994.
- 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.
- ZINGG, H. H., LAPORTE, S., A. The oxytocin receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism.**, v 14, n. 5, p. 222-229, 2003.
- 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.
- ZIOLO, M.T., BERS, D. M. The real estate of NOS signaling: location, location, location. **Circ Res.**, v. 92, p. 1279-1281, 2003.