



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LINCOLN RANGEL DE MEDEIROS TEIXEIRA

6-NITRODOPAMINA É O AGENTE INOTRÓPICO POSITIVO ENDÓGENO
MAIS POTENTE NO CORAÇÃO ISOLADO DE RATO

*6-NITRODOPAMINE IS THE MOST POTENTE ENDOGENOUS POSITIVE
INOTROPIC AGENTE IN THE ISOLATED RAT HEART*

CAMPINAS

2024

LINCOLN RANGEL DE MEDEIROS TEIXEIRA

6-NITRODOPAMINA É O AGENTE INOTRÓPICO POSITIVO ENDÓGENO MAIS
POTENTE NO CORAÇÃO ISOLADO DE RATO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI
COORIENTADOR: JOSÉ BRITTO JÚNIOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO LINCOLN RANGEL DE MEDEIROS TEIXEIRA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

CAMPINAS
2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

T235s Teixeira, Lincoln Rangel de Medeiros, 1982-
6-nitrodopamina é o agente inotrópico positivo endógeno mais potente no
coração isolado de rato / Lincoln Rangel de Medeiros Teixeira. – Campinas, SP
: [s.n.], 2024.

Orientador: Gilberto de Nucci.

Coorientador: Britto Júnior, José.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Catecolaminas. 2. Agentes inotrópicos cardíaco-positivos. 3. L-NAME. I.
De Nucci, Gilberto, 1958-. II. 1991. III. Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: 6-nitrodopamine is the most potente endogenous positive inotropic
agente in the isolated rat heart

Palavras-chave em inglês:

Catecholamines

Cardiotonic agents

NG-nitroarginine methyl ester

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Lindemberg da Mota Silveira Filho

Jose Eduardo Tanus dos Santos

Data de defesa: 21-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(s) aluno(s)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9526-8842>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/05020593698371496>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

NOME DO ALUNO – COMO CONSTA NA ATA DE DEFESA

ORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI

COORDINADOR: JOSÉ BRITTO JÚNIOR

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

2. PROF. DR. LINDEMBERG DA MOTA SILVEIRA FILHO

3. PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 21/06/2024

RESUMO

As catecolaminas são compostos orgânicos que possuem, em sua estrutura, um grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado por uma ponte de etil a um grupo de amina. São encontradas no sistema nervoso simpático, na medula adrenal, e estão distribuídas em várias regiões do sistema nervoso central, sendo as principais catecolaminas, dopamina, norepinefrina e epinefrina, formando uma classe de neurotransmissores químicos e hormonais. A dopamina é um neurotransmissor amplamente conhecido por seu papel nas funções cerebrais, no entanto, também foi demonstrado que a dopamina exerce efeitos inotrópicos positivos no coração, aumentando a força de contração. As nitrocatecolaminas são uma nova classe de catecolaminas. A primeira indicação de produção endógena de nitrocatecolamina surgiu ao se observar que os níveis de noradrenalina detectados por microdiálise do núcleo paraventricular hipotalâmico de ratos diminuía após a perfusão do tecido com uma solução contendo óxido nítrico (NO). A 6-nitrodopamina (6-ND) também faz parte das novas catecolaminas e, através da utilização de espectroscopia de massa em tandem por eletropulverização positiva para HPLC (HPLC-MS/MS), foi identificada a liberação basal de 6-ND em diversos tecidos vasculares *in vitro*, como artéria e veia umbilical e poplítea humana, como, também, em aorta de *Chenoidis carbonária*, *Pantheophi guttatus* e *Callitrix spp.* Além dos tecidos vasculares, a liberação basal de 6-ND foi observada em átrio e ventrículo direito isolado de rato, camundongo e coelho, e ducto deferente isolado de rato e humano. O objetivo deste estudo foi investigar se a 6-ND é o agente endógeno mais potente em relação aos parâmetros de inotropismo positivo no coração isolado de rato. Para tanto, foram utilizados os ventrículos direito e esquerdo, isolados em bloco, de cada coração de rato, e suspensos em um banho de órgão de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit (KHS; em mM: NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,7, NaHCO₃ 24,9, KH₂PO₄ 1,2, dextrose 11, piruvato de sódio 2, pH 7,4) continuamente gases com uma mistura (95% O₂: 5% CO₂) a 37 °C, suplementada com ácido ascórbico (1 mM) para prevenir oxidação de catecolaminas. Nossos resultados mostraram que os ventrículos isolados apresentaram liberação basal de 6-ND, a qual foi significativamente inibida pelo pré-tratamento (30 min) com L-NAME (100 µM). A liberação basal de 6-ND também foi reduzida nos ventrículos obtidos de ratos tratados cronicamente com L-NAME. A incubação de ventrículos isolados de ratos com TTX (30 min, 1 µM) não teve efeito na liberação basal de 6-ND.

Os níveis de dopamina, noradrenalina e adrenalina não foram detectados em todas as amostras estudadas. Posterior, realizamos o tratamento crônico (4-6 semanas) nos ratos com L-NAME (20 mg/dia) na água de beber, e os corações foram isolados e perfundidos *in vitro* utilizando a preparação de Langendorff. Os corações obtidos dos animais tratados cronicamente com L-NAME apresentaram uma pressão de desenvolvimento do ventrículo esquerdo significativamente menor. Como também foram evidenciadas alterações significativamente menores nos seguintes parâmetros, taxa máxima de aumento da pressão do ventrículo esquerdo (dP/dtmax), frequência cardíaca, e produto de pressão, em comparação aos corações obtidos dos animais controle. Os resultados com a preparação de Langendorff demonstram que 6-ND é um agente inotrópico positivo muito potente, sendo mais potente que a dopamina e a noradrenalina (mil vezes) e a adrenalina (dez mil vezes). 6-ND deve ser considerado o agente inotrópico endógeno mais potente já relatado, uma vez que a síntese/liberação de 6-ND dos ventrículos é significativamente reduzida após a inibição aguda e crônica da sintase de NO.

Palavras-chaves: Catecolaminas, 6-nitrocatecolamina, L-NAME, Inotropismo.

ABSTRACT

Catecholamines are organic compounds that possess in their structure a catechol group (3,4-dihydroxybenzene) linked by an ethyl bridge to an amine group. They are found in the sympathetic nervous system, in the adrenal medulla, and are distributed in various regions of the central nervous system, with the main catecholamines being dopamine, norepinephrine, and epinephrine, forming a class of chemical and hormonal neurotransmitters. Dopamine is a neurotransmitter widely known for its role in brain functions; however, it has also been shown that dopamine exerts positive inotropic effects on the heart, increasing contraction strength. Nitrocatecholamines are a new class of catecholamines. The first indication of endogenous nitrocatecholamine production arose when observing that the levels of noradrenaline detected by microdialysis of the paraventricular hypothalamic nucleus in rats decreased after tissue perfusion with a solution containing nitric oxide (NO). 6-nitrodopamine (6-ND) is also part of the new catecholamines, and through the use of tandem mass spectrometry by positive electrospray ionization for HPLC (HPLC-MS/MS), basal release of 6-ND was identified in various in vitro vascular tissues such as human umbilical artery and vein, human popliteal artery, as well as aorta from *Chenoidis carbonaria*, *Pantheophi guttatus*, and *Callitrix* spp. In addition to vascular tissues, basal release of 6-ND was observed in isolated right atrium and ventricle of rat, mouse, and rabbit, and isolated rat and human vas deferens. The aim of this study was to investigate whether 6-ND is the most potent endogenous agent regarding positive inotropic parameters in the isolated rat heart. To this end, the left and right ventricles, isolated as a block, from each rat heart were used and suspended in a 5 mL organ bath containing Krebs-Henseleit solution (KHS; in mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.7, NaHCO₃ 24.9, KH₂PO₄ 1.2, dextrose 11, sodium pyruvate 2, pH 7.4) continuously gassed with a mixture (95% O₂: 5% CO₂) at 37 °C, supplemented with ascorbic acid (1 mM) to prevent catecholamine oxidation. Our results showed that isolated ventricles exhibited basal release of 6-ND, which was significantly inhibited by pre-treatment (30 min) with L-NAME (100 µM). Basal release of 6-ND was also reduced in ventricles obtained from rats chronically treated with L-NAME. Incubation of isolated rat ventricles with TTX (30 min, 1 µM) had no effect on basal release of 6-ND. (Levels of dopamine, norepinephrine, and adrenaline were not detected in all samples studied. Subsequently, chronic treatment (4-6 weeks) of rats with L-NAME (20 mg/day) in

drinking water was performed, and hearts were isolated and perfused in vitro using the Langendorff preparation. Hearts obtained from animals chronically treated with L-NAME exhibited significantly lower left ventricular development pressure. Additionally, significantly smaller alterations were evidenced in the following parameters: maximum rate of left ventricular pressure increase (dP/dt_{max}), heart rate, and pressure-product, compared to hearts obtained from control animals. Results with the Langendorff preparation demonstrate that 6-ND is a very potent positive inotropic agent, being more potent than dopamine and norepinephrine (thousand times) and adrenaline (ten thousand times). 6-ND should be considered the most potent endogenous inotropic agent ever reported, as the synthesis/release of 6-ND from the ventricles is significantly reduced after acute and chronic inhibition of NO synthesis.

Keywords: Catecholamines, 6-nitrocatecholamine, L-NAME, Inotropism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 A síntese das catecolaminas.....	10
1.2 A Dopamina.....	12
1.3 A 6-nitrodopamina	14
1.4 O óxido nítrico	15
1.5 Óxido nítrico sintase	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
2. METODOLOGIA.....	19
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	38
5-CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	55
Anexo 1- Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UNICAMP	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 A síntese das catecolaminas

As catecolaminas são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura um grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado por uma ponte de etil a um grupo de amina¹. As catecolaminas estão presentes no sistema nervoso simpático, na medula adrenal e são distribuídas por diversas regiões do sistema nervoso central (SNC)¹.

As principais catecolaminas são a dopamina, norepinefrina e epinefrina, constituindo uma classe de neurotransmissores químicos e hormonais^{2,3}. Suas principais funções são regular os processos fisiológicos e contribuir para o desenvolvimento de condições neurológicas psiquiátricas, endócrinas e cardiovasculares^{2,3}.

As catecolaminas são produzidas a partir da tirosina⁴. A primeira etapa envolve a hidroxilação da tirosina para formar L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), uma reação catalisada pela enzima tirosina hidroxilase⁴. Após a sua formação, o L-DOPA é descarboxilado para dopamina (DA) pela L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Uma vez sintetizada, a DA pode ser convertida em norepinefrina (NE) por ação da enzima dopamina-beta-hidroxilase (DA-B-hidroxilase). A NE, por sua vez, pode ser transformada em epinefrina em neurônios que contenham a enzima feniletanolamina-N-metiltransferase^{3,4,5}.

A maior parte da epinefrina presente nas terminações nervosas ou células cromafins está armazenada em vesículas e, em situações normais, apenas uma pequena porção está na forma livre no citoplasma⁶. O transportador vesicular de monoaminas (VMAT) é responsável por manter as concentrações nas vesículas. O VMAT, diferentemente do transportador de aminas encarregado pela captação de NE nas terminações nervosas, faz uso do gradiente trans vesicular de prótons como força motriz^{6,7}. Uma vez liberada na fenda sináptica, o efeito da NE acaba, principalmente, pela sua captura nas terminações nervosas noradrenérgicas. A epinefrina e a NE circulantes são degradadas enzimaticamente. As principais enzimas que metabolizam as catecolaminas se localizam no espaço intracelular,

por esse motivo, elas precisam ser captadas pelas células para que ocorra sua degradação metabólica^{3,8,9}.

A recaptura neuronal da NE é mediada pelo transportador de norepinefrina (NET) localizado na membrana celular. Esse transportadores funcionam como cotransportador de Cl^- , Na^+ e a amina correspondente, aproveitando o gradiente de sódio como força motora^{10,11}. Uma vez no compartimento celular, uma parte da NE é armazenado dentro de vesículas por meio da ação do VMAT. A aquisição pós-sináptica de noradrenalina é conduzida pelo transportador extra neuronal de monoaminas (EMT), que compõem um grupo de transportadores de cátions orgânicos extensa e amplamente distribuídos^{10,11}. O NET apresenta alta seletividade para noradrenalina, demonstrando elevada afinidade com uma velocidade de captação reativamente baixa. Este transportador desempenha um papel crucial na preservação dos estoques de NE. O EMT tem uma capacidade de transporte superior em comparação com o NET⁹.

As catecolaminas exógenas e endógenas são predominantemente degradadas por duas enzimas celulares: monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT). A MAO, que abrange as isoformas MAO-A e MAO-B, encontra-se nas mitocôndrias, mais precisamente em suas membranas externas. Estando amplamente presente nas terminações nervosas noradrenérgicas, mas sendo encontrada em outros tecidos como fígado e epitélio intestinal^{9,11}.

A MAO transforma catecolaminas em sua aldeídos correspondentes, os quais são prontamente degradados pela aldeído-desidrogenase em seus ácidos carboxílicos correspondentes (a norepinefrina produz o 3,4-di-hidroxifenilglicol) na periferia^{4,11}. Além disso, a MAO oxida outras monoaminas, incluindo a serotonina e a dopamina. Dentro dos neurônios simpáticos, a MAO desempenha uma importante função na regulação da quantidade de DA e NE^{4,11}. As principais vias metabólicas da NE incluem o ramo oxidativo, cujo catalisador é a dopamina β -hidroxilase (ADH), resultando no ácido vanilmandélico (VMA) como principal metabólico urinário. A via redutora, medida pela aldeído-redutase- (AR), gera um metabolito menos prevalente, o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicólico (MHPG), o qual é conjugado com sulfato de MHPG antes de ser excretado¹¹.

1.2 A Dopamina

A dopamina (DA) foi sintetizada pela primeira vez em 1910^{12,13}. Por volta de 1930, ela foi identificada como um composto intermediário na produção de epinefrina e NE. No entanto, acreditava-se que a DA era mais do que apenas esse intermediário na biossíntese dessas catecolaminas. Apenas no começo da década de 50 que a DA foi encontrada armazenada em tecidos, indicando a possibilidade de possuir uma função de sinalização própria¹³. Ao fim da década, Carlsson e Montagu¹³ encontraram estoques de DA no cérebro. Posteriormente, Hornykiewicz^{12,13} constatou uma falta de DA no cérebro comprometida pela doença de Parkinson, estimulando o interesse na função da dopamina em distúrbios e doenças neurológicas¹²⁻¹⁵.

A DA está estreitamente associada à melanina, um pigmento sintetizado a partir de uma reação oxidativa da DA, L-DOPA ou tirosina. A melanina está presente na pele e na cutícula, atribuindo à substância negra o seu nome característico devido à sua coloração escura^{12,15-18}. Ambas a L-DOPA e a DA são rapidamente oxidadas por processos não enzimáticos, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio citotóxicas e quinonas^{12,15-18}. Essas quinonas da L-DOPA e da DA estabelecem adutos com a alfa-sinucleína, o componente principal dos corpos de Lewy, no Parkinson. A DA é um composto polar, apresentando dificuldade para atravessar a barreira hematoencefálica^{12,15-18}.

A DA é sintetizada por uma via biossintética semelhante à da 5-HT. A tirosina e a fenilalanina são os aminoácidos precursores da DA. Na maioria dos mamíferos, a enzima fenilalanina hidroxilase converte a fenilalanina em tirosina. A diminuição nos níveis desta enzima resulta em um aumento na concentração de fenilalanina, gerando a fenilcetonúria. Para evitar comprometimento intelectual, a fenilcetonúria deve ser controlada por meio de restrições na dieta^{14,15,17}.

O cérebro consegue captar a tirosina com facilidade. Entretanto, diferentemente do triptofano, a quantidade da tirosina no cérebro costuma estar saturada^{14-16,19}. A transformação da tirosina em L-DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina) pela tirosina hidroxilase representa a etapa limitante na

produção da dopamina. A tirosina hidroxilase é uma enzima multifuncional, que depende de ferro e de um cofator biopterina; sua ação é controlada por fosforilação e pela inibição pelo produto ^{14-16, 19}.

Quatro isoformas da tirosina hidroxilase são descritas em humanos, o que difere de muitos primatas não humanos (duas), e dos ratos (apenas uma). Ainda não se sabe se as diferentes isoformas apresentam funções distintas. Assim que formado, o L-DOPA é convertido em dopamina por intermédio da enzima AADC, também responsável pela conversão de L-5-hidroxitriptofano em 5-HT^{14-16,20}

No sistema nervoso central (SNC) e na periferia, a AADC apresenta uma atividade elevada, dificultando a medição fácil dos níveis basais de L-DOPA. A L-DOPA, diferentemente da DA, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, sendo então transformada em DA, justificando a eficácia da L-DOPA no tratamento do Parkinson¹⁵.

As vias cerebrais onde a DA está mais presente incluem a projeção conectada à substância negra, o neoestriado, e a projeção que comunica a região tegmental ventral com as estruturas limbicas, especialmente o córtex límbico¹⁵. A eficácia terapêutica da levodopa, um medicamento antiparkinsoniano, está vinculada à primeira área, enquanto se acredita que a eficácia terapêutica dos medicamentos antipsicóticos esteja ligada à segunda. Além disso, os neurônios dopaminérgicos no hipotálamo ventral exercem uma função crucial na regulação da hipófise¹⁸.

Cinco subtipos de receptores de DA são descritos, sendo que todos são metabotrópicos, ou seja, exercem suas ações por meio de segundos mensageiros, e não diretamente na abertura de canais iônicos. Esses receptores de DA são divididos em duas subfamílias, a saber, os subtipos de receptores tipo D1 (D1R e D5R), acoplados a Gs, ativando a adenilil ciclase, e a subfamília tipo D2 (D2R, D3R e D4R) acoplada a Gi, inibindo a adenilil ciclase²¹.

Em geral, a DA exerce uma ação moduladora e pode ter efeitos tanto inibitórios quanto excitatórios sobre os neurônios do SNC, dependendo do receptor específico ativado e do contexto neural. Essa ação foi mais detalhadamente descrita nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, nos quais a ativação do receptor D2 induz a abertura dos canais de potássio por meio da proteína de acoplamento Gi¹⁷.

1.3 A 6-nitrodopamina

A primeira indicação de produção endógena de nitrocatecolaminas surgiu ao observar que os níveis de noradrenalina detectados por microdiálise do núcleo paraventricular hipotalâmico de ratos diminuía após a perfusão do tecido com uma solução contendo óxido nítrico (NO)²². Empregando 6-nitronoradrenalina, sintetizada por meio da insuflação de NO, em uma solução contendo cloridrato de noradrenalina como referência, extratos de cérebro suíno foram submetidos à análise por cromatografia de alta pressão acoplada à detecção eletroquímica. Sendo identificado um pico com tempo de retenção idêntico ao padrão, caracterizado como 6-nitronoradrenalina, por meio de espectrometria UV, espectrometria de massa (MS) e espectroscopia de RMN²². Usando a mesma metodologia, a presença de 6-nitronoradrenalina foi identificada em extratos de cérebro de ratos. As quantidades de 6-nitronoradrenalina foram significativamente reduzidas (aproximadamente 60-70%), mas não totalmente eliminadas, em extratos de cérebro de ratos previamente tratados com o inibidor da síntese de NO, L-NAME²².

A reação de catecolaminas com nitrito de sódio gerou a 6-nitronoradrenalina, 6-nitroadrenalina e 6-nitrodopamina²³, posterior, a presença de 6-nitronoradrenalina e 6-nitronoradrenalina em extratos de cérebro de rato foi quantificada por HPLC²⁴. O transporte de noradrenalina em sinaptossomas de ratos é inibido por 6-NN²², e a administração intratecal de 6-NN induz analgesia devido à liberação de noradrenalina²⁵. Essas observações indicam que as nitrocatecolaminas podem atuar como mediadores neuronais no SNC.

A liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), medida por espectroscopia de massa em tandem por eletropulverização positiva para HPLC (HPLC-MS/MS), foi identificada em diversos tecidos vasculares *in vitro* de artéria e veia umbilical humanas²⁶, artéria e veia poplítea humanas²⁷, aorta de *Chelonoidis carbonaria*²⁸, aorta de *Pantherophis guttatus*²⁹, e artéria e aorta pulmonar obtidas do sagui *Callitrix spp*³⁰

Além dos tecidos vasculares, a liberação basal de 6-ND foi observada em átrio direito isolado de rato³¹, átrios e ventrículos direitos isolados de

camundongo³², átrios e ventrículos isolados de coelho³³, ducto deferente isolado de rato³⁴, e ducto deferente isolado humano³⁵

1.4 O óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki³⁶ evidenciaram que o relaxamento vascular provocado pela acetilcolina dependia da existência do endotélio. Eles destacaram que esse fenômeno era mediado por um fator humoral instável, futuramente identificado como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF)^{36,37}. Ao longo dos anos 80, demonstrou-se que esse EDRF era muito semelhante ao óxido nítrico (NO). Mas, apenas em 1992, que o NO foi plenamente reconhecido como essa molécula³⁸.

O NO pode atuar como oxidante ou como redutor a depender do meio no qual se encontra e pode reagir facilmente com oxigênio, produzindo nitrito e nitrato^{39,40}. A molécula de óxido nítrico (NO) apresenta o menor peso molecular entre os produtos de secreção celular de mamíferos. Ela apresenta uma meia-vida curta e pouca especificidade em suas reações⁴¹. Trata-se de um composto citotóxico e vasodilatador que participa na modulação de reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, conforme o tipo celular e o estímulo apresentado^{42,43}.

A estrutura molecular do NO possui um elétron não pareado capaz de reagir facilmente com radicais superóxido, oxigênio ou metais de transição, como cobalto, ferro e manganês ou cobre⁴⁴. O NO apresenta uma elevada afinidade com o grupo heme, encontrado em diversas proteínas intracelulares (ciclooxigenase, guanilato ciclase e NOS) e, também, consegue se ligar a grupos -SH, produzindo tiol⁴⁵; é um gás estável e incolor, moderadamente solúvel em água e apresenta uma meia-vida que varia de três a 60 segundos, podendo durar por mais tempo a depender da concentração de O₂ e O₂⁻ do ambiente^{46- 52}.

O NO é sintetizado, principalmente, a partir da arginina. Dentro das células endoteliais dos vasos, a L-arginina, quando há oxigênio molecular, produz NO e L-citrulina por meio de uma reação catalisada pelo óxido nítrico-sintase (NOS)⁴⁹. O óxido nítrico transpassa o endotélio em direção à musculatura lisa vascular, ativando de maneira direta a enzima guanilato ciclase solúvel, promovendo o aumento intracelular de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina). Esse

processo leva ao relaxamento do musculo liso ao redor dos vasos, gerando vasodilatação⁵³. Essa interação da guanilil ciclase solúvel com o NO provoca muitos efeitos fisiológicos e patofisiológicos³⁷.

O NO participa de vários processos biológicos, como inibição da ativação, relaxamento vascular, citotoxicidade mediada por macrófagos, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, adesão e agregação plaquetária, depressão sináptica a longo prazo, potencialização da transmissão sináptica a longo prazo, regulação da pressão sanguínea basal, prevenção de piloro espasmo em estenose pilórica hipertrófica infantil e microcirculação medular e glomerular. A atuação do NO foi descrita no cerebelo, endotélio, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), neutrófilos, macrófagos, células epiteliais pulmonares, rins, miocárdio e mucosa gastrintestinal^{40,54-57}. O NO também pode desempenhar um papel na vasodilatação associada à angiogênese, tanto fisiológica quanto patológica, como observado em casos de tumores⁵⁸.

1.5 Óxido nítrico sintase

O NO é formado pela ação da enzima óxido nítrico-sintase (NOS). Na literatura, são descritas três isoformas dessa enzima, sendo duas constitutivas (cNOS) e uma induzida (iNOS)^{40,59}. Essa enzima se encontra no citosol e precisa de cofatores, como o tetrahidrobiopterina (BH4), o heme, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e o NADPH⁴⁷. A cNOS basal é estimulada pelo aumento na concentração celular de cálcio em decorrência da ativação de receptores presentes na superfície da célula e dos mecanismos de transdução do sinal⁴². A administração de glicocorticoides não afeta sua síntese⁴⁶. Por outro lado, a iNOS não requer cálcio para ser ativada, mas, para a sua atuação, é preciso sintetizar mRNA³⁷.

A isoforma I, ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS), representa uma NOS constitutiva e está localizada em células epiteliais, neurônios, SN periférico, SNC, sistema NANC, medula adrenal, mácula densa do rim, músculo esquelético, células b pancreática, órgão sexual masculino e outros³⁷. A nNOS apresenta grande importância fisiológica, uma vez que ela participa de diversas

sinapses no SNC; contribui para a regulação central da pressão arterial, o relaxamento do músculo liso e a vasodilatação através dos nervos periféricos³⁷.

A isoforma II, ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), é uma NOS que é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos e está presente tanto no endotélio quanto na musculatura lisa vascular³⁷. Uma vez ativada, ela gera uma quantidade significativa de NO, que exerce uma função citostática, além de causar fragmentação de DNA.

A isoforma III, também conhecida como óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), constitui uma forma constitutiva de NOS, que gera NO dentro do endotélio vascular em condições basais. No entanto, a força de cisalhamento gerada pelo fluxo sanguíneo pode aumentar sua produção³⁷. O NO liberado na luz dos vasos sanguíneos promove inibição da adesão e agregação plaquetária, além de inibir a adesão leucocitária no endotélio vascular. Ele inibe a mitogênese, a síntese de DNA e a proliferação de células musculares lisas vasculares e, também, ajuda no controle da contratilidade cardíaca e pressão arterial^{60,61}.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar se a 6-nitrodopamina é o agente endógeno mais potente em termos de inotropismo positivo no coração isolado de rato.

2.2 Objetivos específicos

I. Avaliar a liberação basal de catecolaminas no ventrículo de ratos, tratados ou não, cronicamente com L-NAME;

II. Avaliar a liberação basal de catecolaminas no ventrículo de ratos controles, não tratados e incubados com L-NAME (100 μ M) ou com o bloqueador do canal de sódio voltagem-dependente tetrodotoxina (TTX; 1 μ M);

III. Determinar os níveis de dopamina, noradrenalina e adrenalina em todas as amostras (limite de quantificação foi de 0,1 ng/mL);

IV. Avaliar o efeito da administração crônica de L-NAME na pressão de desenvolvimento do ventrículo esquerdo (LVDP);

V. Determinar a taxa máxima de aumento da pressão do ventrículo esquerdo (dP/dtmax), e a frequência cardíaca em corações isolados.

VI. Avaliar o efeito de injeções bolus das catecolaminas nos parâmetros de pressão de desenvolvimento do ventrículo esquerdo (LVDP), dP/dtmax e frequência cardíaca.

VII. Avaliar o efeito da infusão de atenolol nos parâmetros aumentados de pressão de desenvolvimento do ventrículo esquerdo (LVDP), dP/dtmax, e frequência cardíaca (FC) induzidos pelas catecolaminas.

2. METODOLOGIA

Design experimental: Animais e tratamento com inibidor de síntese de NO N^oCloridrato de éster metílico de nitro-L-arginina (L-NAME)

Os animais (ratos Wistar machos, pesando 280–320 g) foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP (São Paulo, Brasil). Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA; Protocolo n.º 5746-1/2021; 5831-1/2021). Os animais receberam água filtrada contendo L-NAME na dose de, aproximadamente, 20 mg / rato / dia por um recebeu água filtrada.

Ventrículos isolados de ratos

A eutanásia foi realizada com superdosagem de isoflurano (concentração superior a 5% até 1 min após a interrupção da respiração) seguido de exsanguinação para confirmação da eutanásia. Após a eutanásia, o tórax foi aberto e o coração foi rapidamente excisado. Os ventrículos direito e esquerdo foram isolados em bloco de cada coração de rato e suspensos em um banho de órgão de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit (KHS; em mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.7, NaHCO₃ 24.9, KH₂PO₄ 1.2, dextrose 11, piruvato de sódio 2, pH 7.4) continuamente gaseificado com uma mistura (95% O₂: 5% CO₂) a 37 °C, suplementado com ácido ascórbico (1 mM) para evitar a oxidação das catecolaminas.

Libertação basal de catecolaminas dos ventrículos dos ratos

Os ventrículos direito e esquerdo em bloco de cada rato foram suspensos em um banho de órgão de 5 mL, contendo KHS (pH 7.4; 95% O₂ / 5% de CO₂; 37 °C) contendo ácido ascórbico (1 mM) durante 30 min. Duas alíquotas de 2 mL do sobrenadante foram transferidas para tubos Eppendorf pretos e armazenadas a -20 ° C até a análise. A liberação basal de catecolaminas também foi avaliada a partir de ventrículos obtidos de animais cronicamente tratados com L-NAME e de ventrículos de animais controle incubados com L-NAME (100 µM) ou o bloqueador de canais de sódio dependente de voltagem tetrodotoxina (TTX; 1 µM). E determinação de catecolaminas foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

Análise do coração perfundido de Langendorff e desenho experimental

Heparina (1000 UI / kg) foi injetada i.p. para evitar a coagulação do sangue seguido da eutanásia. O tórax foi aberto e o coração foi rapidamente excisado, a aorta ascendente foi canulada e o coração foi montado em um aparelho de Langendorff não recirculante. O coração isolado foi perfundido com KHS (pH 7,4, 37 °C), equilibrado com mistura gasosa de carbógeno (95% O₂: 5% CO₂) em fluxo constante (10 mL/min) e pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) mantida de 4-10 mm Hg durante o equilíbrio inicial. Um balão de látex cheio de água, conectado ao transdutor de pressão (MLT1199 BP Transducer, ADInstruments, Inc., Dunedin, NZ, EUA), foi inserido no ventrículo esquerdo (VE) através da valva mitral. A pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (DPePDF) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas continuamente por um sistema PowerLab (ADInstruments, Inc., Dunedin, NZ, EUA). A pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDFVE) foi calculada pela seguinte fórmula: $PSVE - DPeDP$ e expressa em mmHg. O produto da frequência pressórica (DP) foi calculado como o produto da frequência cardíaca (FC) e da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (LVDP) da seguinte forma: $DPP = (FC \times LVDP)$. Um coração foi usado para uma única droga e para uma dose única. Apenas corações que apresentaram frequência cardíaca basal entre 250 e 300 bpm foram empregados nos experimentos. Após um período de equilíbrio de pelo menos dez minutos, um único bolus (10 mL) de 6-ND (0,01, 0,1, 1 ou 10 pmol), dopamina (1, 10, 100 ou 1000 pmol), noradrenalina (1, 10, 100 ou 1000 pmol) ou adrenalina (1, 10, 100 ou 1000 pmol) foi injetado. Um coração foi utilizado para uma única droga e para uma dose única (para a avaliação do efeito inotrópico de 0,01 (n = 5), 0,1 (n = 6), 1 (n = 6) e 10 (n = 6) pmol de 6-ND, foram empregados 23 animais).

Efeito da infusão de atenolol no efeito inotrópico positivo induzido por catecolaminas

Após um período de equilíbrio de pelo menos dez minutos, uma infusão de atenolol de dez minutos (100 mL / min) (0,001, 0,01, 0,1 e 1 µM; concentração final) foi realizada antes da injeção em bolus de 6-ND (1 pmol), dopamina (10

nmol), noradrenalina (1 nmol) e adrenalina (1 nmol). O coração foi monitorado por 15 min. Um coração foi usado para um único medicamento e uma única infusão.

Análise estatística

A pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDFVE) foi calculada como a diferença entre os valores da pressão sistólica e diastólica final, recebidos da curva da PDFVE. A pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (DPePDF) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas continuamente por um sistema PowerLab (ADInstruments, Inc., Dunedin, NZ, EUA). A pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDFVE) foi calculada pela seguinte fórmula: $PSVE - DPePDF$ e expressa em mmHg. O produto da frequência presso-pressão (DPP) foi calculado pela seguinte fórmula: $FC \text{ vezes } LVDP$ e expresso em batimentos $\times$ mmHg $\times$ min⁻¹. A taxa máxima de aumento da pressão ventricular esquerda ($+dP/dtMax$) foi monitorada continuamente por um transdutor de pressão conectado a um sistema PowerLab (AD Instrument, Dunedin, Nova Zelândia) e expresso em mmHg $\times$ s⁻¹. As alterações na PDFVE foram expressas como o aumento acima da linha de base. Os dados da frequência cardíaca são apresentados como batimentos por minuto (bpm). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Testes t pareados e não pareados foram usados quando apropriado. As comparações entre três ou mais grupos foram avaliadas por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman-Keuls.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação são apresentados em formato de artigos publicados na revista *Life*, sob o título: “*6-Nitrodopamine Is the Most Potent Endogenous Positive Inotropic Agent in the Isolated Rat Heart*”. Os autores do artigo publicado foram: José Britto-Júnior, Lincoln Rangel Medeiros-Teixeira, Antonio Tiago Lima, Letícia Costa Dassow, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes-Martins, Rafael Campos, Manoel Odorico Moraes, Maria Elisabete A. Moraes, Edson Antunes, Gilberto De Nucci. A publicação foi realizada em formato *on-line*, em 04 de outubro de 2023.



Article

6-Nitrodopamine Is the Most Potent Endogenous Positive Inotropic Agent in the Isolated Rat Heart

José Britto-Júnior ¹, Lincoln Rangel Medeiros-Teixeira ¹, Antonio Tiago Lima ¹, Leticia Costa Dassow ², Rodrigo Álvaro Brandão Lopes-Martins ², Rafael Campos ^{1,3}, Manoel Odorico Moraes ³, Maria Elisabete A. Moraes ³, Edson Antunes ¹ and Gilberto De Nucci ^{1,2,3,4,*}

- ¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-970, Brazil; josebrittojr@dac.unicamp.br (J.B.-J.); l219199@dac.unicamp.br (L.R.M.-T.); a234935@dac.unicamp.br (A.T.L.); racampos@unicamp.br (R.C.); eantunes@unicamp.br (E.A.)
- ² Laboratory of Biophotonics and Experimental Therapeutics, University Evangélica de Goiás (UniEVANGÉLICA), Anápolis 75083-515, Brazil; lldassow@gmail.com (L.C.D.); ralopesmartins@gmail.com (R.Á.B.L.-M.)
- ³ Clinical Pharmacology Unit, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza 60020-181, Brazil; odorico@ufc.br (M.O.M.); betemora@ufc.br (M.E.A.M.)
- ⁴ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-220, Brazil
- * Correspondence: denucci@unicamp.br



Citation: Britto-Júnior, J.; Medeiros-Teixeira, L.R.; Lima, A.T.; Dassow, L.C.; Lopes-Martins, R.Á.B.; Campos, R.; Moraes, M.O.; Moraes, M.E.A.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-Nitrodopamine Is the Most Potent Endogenous Positive Inotropic Agent in the Isolated Rat Heart. *Life* **2023**, *13*, 2012. <https://doi.org/10.3390/life13102012>

Academic Editors: Nadezhda G. Gumanova and Alexander Kots

Received: 2 September 2023

Revised: 1 October 2023

Accepted: 2 October 2023

Published: 4 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: 6-nitrodopamine released from rat isolated atria exerts positive chronotropic action, being more potent than noradrenaline, adrenaline, and dopamine. Here, we determined whether 6-nitrodopamine is released from rat isolated ventricles (RIV) and modulates heart inotropism. Methods: Catecholamines released from RIV were quantified by LC-MS/MS and their effects on heart inotropism were evaluated by measuring left ventricular developed pressure (LVDP) in Langendorff's preparation. Results: 6-nitrodopamine was the major released catecholamine from RIV. Incubation with L-NAME (100 μ M), but not with tetrodotoxin (1 μ M), caused a significant reduction in 6-nitrodopamine basal release. 6-nitrodopamine release was significantly reduced in ventricles obtained from L-NAME chronically treated animals. 6-nitrodopamine (0.01 pmol) caused significant increases in LVDP and dP/dt_{max} , whereas dopamine and noradrenaline required 10 pmol, and adrenaline required 100 pmol, to induce similar increases in LVDP and dP/dt_{max} . The infusion of atenolol (10 nM) reduced basal LVDP and blocked the increases in LVDP induced by 6-ND (0.01 pmol), without affecting the increases in LVDP induced by 10 nmol of dopamine and noradrenaline and that induced by adrenaline (100 nmol). Conclusions: 6-nitrodopamine is the major catecholamine released from rat isolated ventricles. It is 1000 times more potent than dopamine and noradrenaline and is selectively blocked by atenolol, indicating that 6-ND is a main regulator of heart inotropism.

Keywords: atenolol; b-blocker; tetrodotoxin; L-NAME

1. Introduction

Myocardial inotropism and lusitropism are modulated by the β -adrenoceptors (β -AR) β_1 -AR and β_2 -AR, which are mainly located in human cardiomyocytes (β_1 -/ β_2 -AR ratio is 80%:20%) [1]. A higher preponderance of β_1 -AR over β_2 -AR has also been observed in rat right and left atria (67–33%, respectively) [2] and in the rat left ventricle [3]. The β_3 -adrenoceptors are also expressed in the heart [4], but they are associated with a negative inotropic response [5].

The catecholamines noradrenaline and adrenaline are known as potent positive chronotropic and inotropic agents through β -AR activation [6]. When these receptors are activated, they cause intracellular signaling via G protein modulation of adenylyl cyclases, a family of enzymes responsible for cAMP production [7]. β_1 agonists such as

dobutamine increase tissue cAMP production through the β -adrenergic-mediated stimulation of adenylate cyclase [8]. The current understanding is that under basal conditions, cAMP levels are modulated by either intrinsic β -AR activities or by classical catecholamine baseline levels. Interestingly, cAMP is rapidly hydrolyzed by phosphodiesterases (PDEs) and the latter plays an important part in directing intracellular cAMP propagation [9,10]. Indeed, the use of selective phosphodiesterase (PDE) type 3 inotropes such as milrinone [11] or enoximone [12] provokes indirect increases in cAMP production, and the inhibition of PDE3 or PDE4 augments the noradrenaline-induced positive inotropic effects in the human atrium [13].

The novel catecholamine 6-nitrodopamine (6-ND) is released from the human umbilical cord artery and vein [14], aortae obtained from the tortoise *Chelonoidis carbonarius* [15] and the marmoset *Callithrix* spp. [16], and human [17] and rat vas deferens [18] and right atria [19]. In the atria, 6-ND acts as a potent modulator of heart chronotropism, being more potent than noradrenaline and adrenaline ($100\times$), and dopamine ($10,000\times$) [19]. Incubation of the atria with the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME causes a significant reduction in 6-ND basal released levels, whereas incubation with the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin does not affect it, indicating that in contrast to noradrenaline, the origin of 6-ND is not neurogenic [19]. Indeed, the release of 6-ND from mice isolated atria and ventricles was significantly reduced in eNOS^{-/-}, but not in nNOS^{-/-} or iNOS^{-/-} mice [20]. Another characteristic of the 6-ND chronotropic effect in the rat isolated atria is that the 6-ND-induced positive chronotropic effect was selectively blocked by the β_1 -adrenoceptor antagonists atenolol, betaxolol, and metoprolol, since the concentrations employed had no effect on the chronotropism increases provoked by the classical catecholamines [19].

Since noradrenaline and adrenaline are considered potent stimulators of heart inotropism [21], whether 6-ND is released from rat isolated ventricles and whether it modulates heart inotropism in Langendorff's preparation was investigated [22].

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The animals (male Wistar rats, weighing 280–320 g) were acquired from CEMIB-UNICAMP (São Paulo, Brazil). The protocols were approved by the local ethics committee (CEUA; Protocol No. 5746-1/2021; 5831-1/2021) according to the Brazilian Guidelines (CONCEA) [23]; and the ARRIVE guidelines [24].

2.2. Treatment with NO Synthesis Inhibitor N^w-Nitro-L-arginine Methyl Ester Hydrochloride (L-NAME)

Animals were given filtered water containing L-NAME at a dose of approximately 20 mg/rat/day for a minimum of 4 weeks and a maximum of 6 weeks [25]. Control animals were treated with filtered water.

2.3. Rat Isolated Ventricles

Isoflurane overdose was employed for euthanasia and the animals were exposed to a concentration greater than 5% until 1 min after breathing stopped. Exsanguination was performed to confirm the euthanasia. After euthanasia, the chest was opened and the heart was rapidly excised. The right and left ventricles were isolated en bloc from each rat heart and suspended in a 5 mL organ bath containing Krebs–Henseleit solution (KHS; in mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.7, NaHCO₃ 24.9, KH₂PO₄ 1.2, dextrose 11, sodium pyruvate 2, pH 7.4) continuously gassed with a mixture (95% O₂: 5% CO₂) at 37 °C, supplemented with ascorbic acid (1 mM) to prevent catecholamine oxidation [26].

2.4. Basal Release of Catecholamines from Rat Ventricles

The right and left ventricles en bloc from each rat were suspended in a 5 mL organ bath containing KHS (pH 7.4; 95% O₂ / 5% CO₂; 37 °C) containing ascorbic acid (1 mM) for 30 min. Two 2 mL aliquots of the supernatant were transferred to black Eppendorf tubes and

erLab system (AD Instrument, Dunedin, New Zealand) and expressed as $\text{mmHg} \times \text{s}^{-1}$. Changes in LVDP were expressed as the increase above the baseline. Data of the heart rate are presented as beats per minute (bpm). The results are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Paired and unpaired *t*-tests were used when appropriate. Comparisons among three or more groups were evaluated using one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test. Actual *p* values are described in Figures.

2.10. Chemical and Reagents

The reagents and suppliers are described in Table 1 below.

Table 1. List of suppliers and chemicals.

Suppliers	Chemicals
Sigma-Aldrich Chemicals Co. (MO, USA)	Dopamine, adrenaline, and L-NAME (N^{ω} -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride)
Cayman Chemicals (MI, USA)	Noradrenaline and tetrodotoxin (TTX)
Toronto Research Chemicals (ON, Canada).	6-Nitrodopamine- d_4 and 6-Nitrodopamine
CDN Isotopes (QC, Canada)	Adrenaline- d_6 hydrochloride, DL-noradrenaline- d_6 hydrochloride, and dopamine- d_3 hydrochloride,
Merck KGaA (Hesse, Germany)	Sodium chloride (NaCl), dextrose, calcium chloride (CaCl_2), magnesium sulfate (MgSO_4), sodium bicarbonate (NaHCO_3), potassium chloride (KCl), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)

3. Results

3.1. Basal Release of Catecholamines from Isolated Ventricles

The isolated ventricles (Figure 1A–C) presented 6-ND basal release, which was significantly inhibited by pre-treating (30 min) the isolated ventricles with L-NAME (100 μM ; Figure 1A, $n = 6$). The basal release of 6-ND was also decreased in the ventricles obtained from rats chronically treated with L-NAME (Figure 1B, $n = 11$). The incubation of rat isolated ventricles with TTX (30 min, 1 μM) had no effect on the 6-ND basal release (Figure 1C, $n = 6$). Dopamine, noradrenaline, and adrenaline levels were undetected in all samples (limit of quantitation was 0.1 ng/mL).

3.2. Effect of the Chronic Administration of L-NAME on the Left Ventricular Developed Pressure (LVDP), $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$, Heart Rate (HR), and Rate Pressure Product (RPP)

The animals were chronically (4–6 weeks) treated with L-NAME (20 mg/day) in the drinking water, and the hearts were isolated and perfused in vitro (Langendorff's preparation). The hearts obtained from the chronically L-NAME-treated animals presented a significantly lower left ventricular developed pressure (Figure 2A), lower maximal rate of rise of left ventricular pressure ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$; Figure 2B), lower heart rate (Figure 2C), and lower rate-pressure product (Figure 2D), compared to hearts obtained from the control animals.

3.3. Effect of Bolus Injections of Catecholamines on the Left Ventricle Developed Pressure (LVDP)

A bolus injection of 6-ND (0.01 pmol) caused a significant increase in the LVDP (Figure 3A). Further increases in the doses of 6-ND (0.1 and 1 pmol) also substantially increased LVDP, but these increases were not significantly different among them (Figure 3A). In contrast to 6-ND, bolus injections (1 pmol) of dopamine (Figure 3B), noradrenaline (Figure 3C), and adrenaline (Figure 3D) caused no increases in LVDP. Bolus injections of higher doses (10–1000 pmol) of dopamine (Figure 3B) and noradrenaline (Figure 3C) caused significant dose-dependent increases in the LVDP. A bolus injection of higher doses (100–1000 pmol) of adrenaline (Figure 3D) caused significant dose-dependent increases in the LVDP.

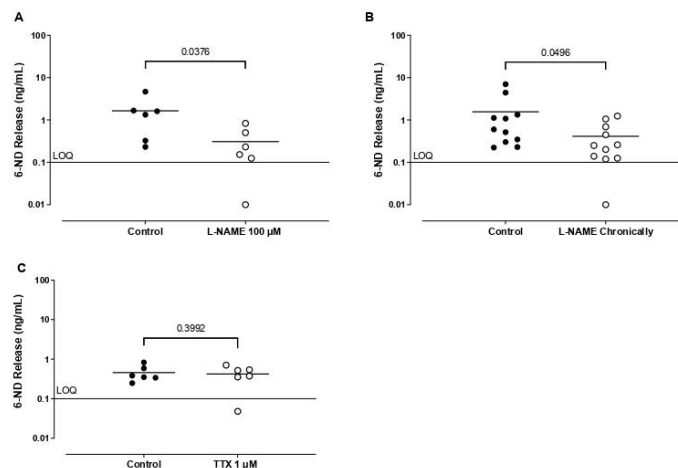


Figure 1. Basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) from rat isolated ventricles. Panel (A) shows the effect of pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 µM) on the basal release of 6-ND from rat isolated ventricles ($n = 6$). Panel (B) shows the basal release of 6-ND from isolated ventricles obtained from control rats and from chronically L-NAME-treated rats (20 mg/kg/day, 4–6 weeks, $n = 11$). Panel (C) shows effect of pre-incubation (30 min) of tetrodotoxin (TTX; 1 µM) on the basal release of 6-ND ($n = 6$).

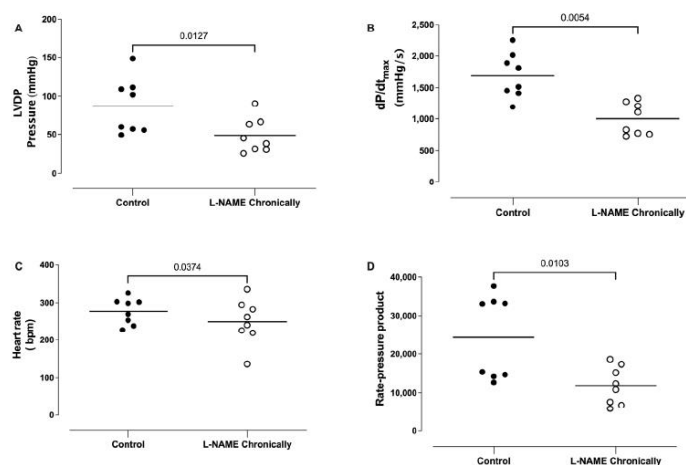


Figure 2. Effect of the chronic treatment with L-NAME on the left ventricular pressure (LVDP), maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max}), heart rate, and rate pressure product (RPP). The animals were treated with L-NAME (20 mg/day for 4–6 weeks), and the hearts isolated and perfused in vitro (Langendorff's preparation). The hearts obtained from chronically L-NAME-treated animals presented significantly lower left ventricular developed pressure (Panel A), lower maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max} ; Panel B), lower heart rate (Panel C), and lower rate-pressure product (Panel D), compared to hearts obtained from control animals. Unpaired t -test.

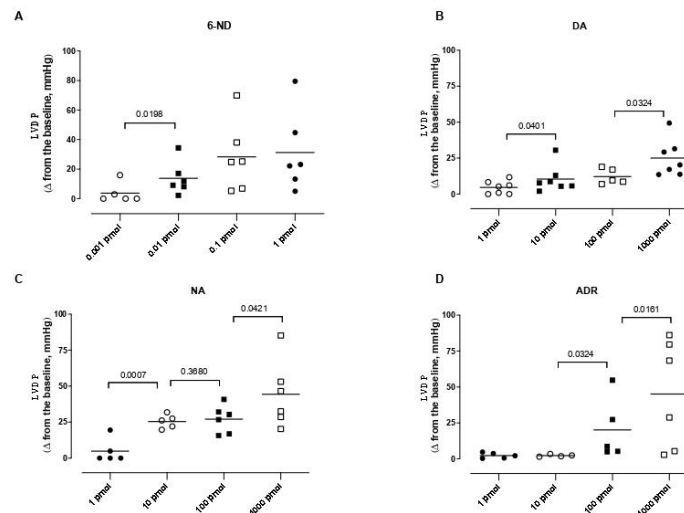


Figure 3. Effect of bolus injections of 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine (DA), noradrenaline (NA), and adrenaline (ADR) on the left ventricular developed pressure (LVDP). Bolus injections of 6-ND (0.01–1 pmol; Panel A), dopamine (10–1000 pmol; Panel B), noradrenaline (10–1000 pmol; Panel C), and adrenaline (100–1000 pmol; Panel D) caused significant increases in the left ventricular developed pressure (LVDP). ANOVA, followed by Newman–Keuls test.

3.4. Effect of Bolus Injections of Catecholamines on dP/dt_{max}

A bolus injection of 6-ND (0.01 pmol) caused a significant increase in the dP/dt_{max} (Figure 4A). Further increases in the doses of 6-ND also substantially increased dP/dt_{max} , but these increases were not significantly different among them (Figure 4A). In contrast to 6-ND, bolus injections (1 pmol) of dopamine (Figure 4B), noradrenaline (Figure 4C), and adrenaline (Figure 4D) caused no increases in the dP/dt_{max} . Bolus injections of higher doses of dopamine (Figure 4B), noradrenaline (Figure 4C), and adrenaline (Figure 4D) caused significant dose-dependent increases in the dP/dt_{max} .

3.5. Effect of Bolus Injections of Catecholamines on the Heart Rate

A bolus injection of 6-ND (0.1 pmol) caused a significant increase in the heart rate (Figure 5A). Further increases in the doses of 6-ND also substantially increased the heart rate, but these increases were not significantly different among them (Figure 5A). In contrast to 6-ND, bolus injections (1 pmol) of dopamine (Figure 5B), noradrenaline (Figure 5C), and adrenaline (Figure 5D) caused no increases in the heart rate. Bolus injections of higher doses (10–1000 pmol) of dopamine (Figure 5B), noradrenaline (Figure 5C), and adrenaline (Figure 5D) caused significant dose-dependent increases in the heart rate.

3.6. Effect of Atenolol Infusion on the Increases in the Left Ventricle Developed Pressure (LVDP) Induced by Catecholamines

The infusion of atenolol (10 nM and 100 nM) almost abolished the increases in the LVDP induced by 1 pmol of 6-ND (Figure 6A). Atenolol (100 nM) significantly reduced the increases in the LVDP induced by adrenaline (1 nmol; Figure 6D), without affecting those induced by either dopamine (1 nmol; Figure 6B) or noradrenaline (Figure 6C). The infusion of atenolol (1 μ M) significantly reduced the increases in the LVDP induced by dopamine (1 nmol; Figure 6B), noradrenaline (1 nmol; Figure 6C), and adrenaline (1 nmol; Figure 6D).

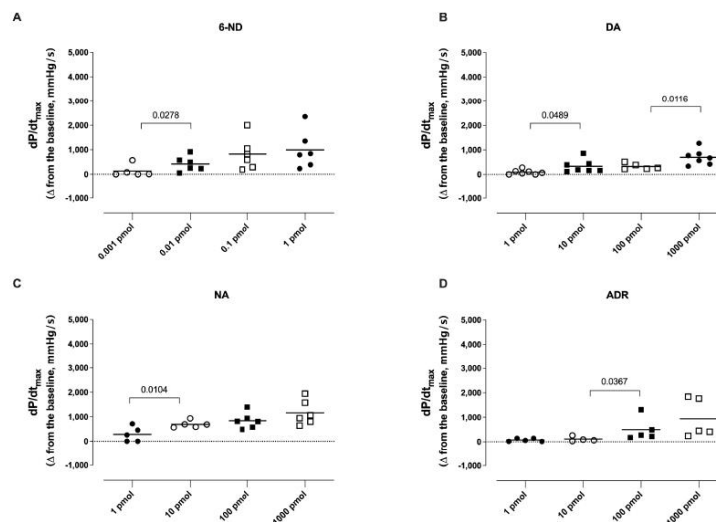


Figure 4. Effect of bolus injections of 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine (DA), noradrenaline (NA), and adrenaline (ADR) on the maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max}). Bolus injections of 6-ND (0.01–1 pmol; Panel A), dopamine (10–1000 pmol; Panel B), noradrenaline (10–1000 pmol; Panel C), and adrenaline (100–1000 pmol; Panel D) caused significant increases in the maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max}). ANOVA, followed by Newman–Keuls test.

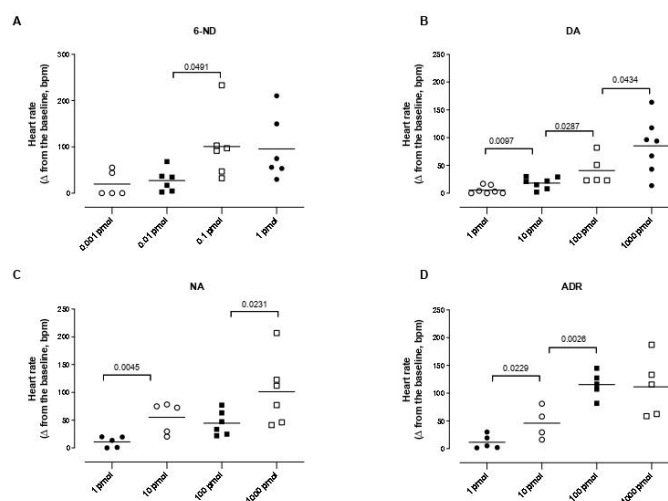


Figure 5. Effect of bolus injections of 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine (DA), noradrenaline (NA), and adrenaline (ADR) on the heart rate (HR). Bolus injections of 6-ND (0.1–1 pmol; Panel A), dopamine (10–1000 pmol; Panel B), noradrenaline (10–1000 pmol; Panel C), and adrenaline (10–1000 pmol; Panel D) caused significant increases in the heart rate. ANOVA, followed by Newman–Keuls test.

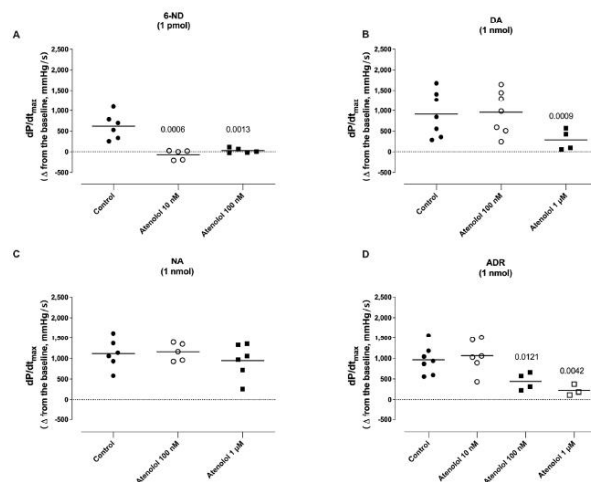


Figure 7. Effect of atenolol infusions (0.01–1 nM) on the maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max}) induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine (DA), noradrenaline (NA), and adrenaline (ADR). Atenolol (10–100 nM) blocked the increases in the dP/dt_{max} induced by 6-ND (1 pmol; Panel A). Atenolol (100 nM) had no effect on the increases in the dP/dt_{max} induced by dopamine (1 nmol; Panel B) and noradrenaline (1 nmol; Panel C), but significantly inhibited the increases in the dP/dt_{max} induced by adrenaline (1 nmol; Panel D). Atenolol (1 μ M) significantly reduced the increases in the dP/dt_{max} induced by dopamine (1 nmol; Panel B), noradrenaline (1 nmol; Panel C), and adrenaline (1 nmol; Panel D). ANOVA, followed by Newman–Keuls test. The p values reflect significance compared to control values.

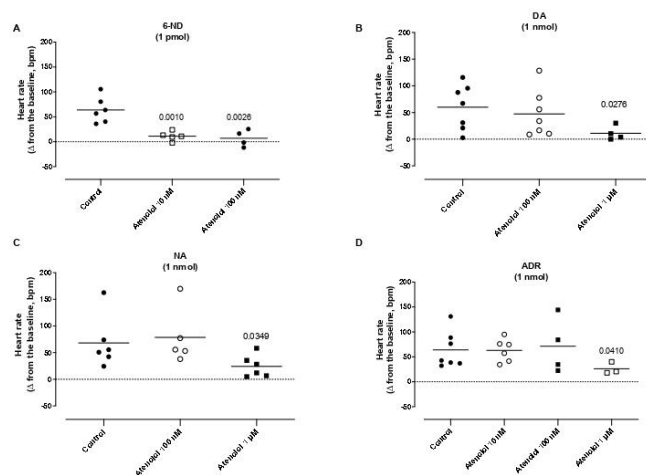


Figure 8. Effect of atenolol infusions (0.01–1 μ M) on the increases in heart rate induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine (DA), noradrenaline (NA), and adrenaline (ADR). Atenolol (10–100 nM) blocked the increases in the heart rate induced by 6-ND (1 pmol; Panel A). Atenolol (100 nM)

rate induced by milrinone or cilostazol [59]. In addition, incubation of 6-ND with human washed platelets was not accompanied by a change in nucleotide levels [60].

β_1 -receptor stimulation in ventricular myocytes activates the G_s -adenylyl cyclase-cAMP-protein kinase A (PKA) with consequent phosphorylation of PKA substrates including L-type calcium channel, cardiac troponin I, and cardiac myosin-binding protein C, causing an increase in calcium transients and contractility [61]. In pacemaker cells, phosphorylation by PKA of membrane ion channels increases calcium cycling and pacing rate. Thus, the activation of β_1 -adrenoceptors by catecholamines is responsible for positive inotropy [62]. It is interesting that selective β_1 -adrenoceptor antagonists, atenolol, betaxolol, and metoprolol, reduced the atrial frequency at concentrations that selectively blocked the increases in atrial rate induced by 6-ND, indicating that the reduction in heart rate induced by β_1 -adrenoceptor antagonists could be due to specific inhibition of the 6-ND receptor, rather than the β_1 -adrenoceptor [19]. Indeed, the same phenomena has been observed here, where atenolol induced a negative inotropic effect at the same concentration that affected the positive inotropic effect of 6-ND but did not alter the positive inotropic effect induced by the classical catecholamines. The finding that atenolol presents a negative inotropic effect in concentrations that selectively affect the 6-ND positive inotropic effect reinforces the concept that 6-ND has a major modulatory role in heart inotropism.

Although the mechanism(s) by which 6-ND causes a positive inotropic and chronotropic effect in the rat isolated heart is unclear, the remarkable potency of this endogenous novel catecholamine presents interesting therapeutic possibilities, mainly in acute heart failure (AHF). This clinical syndrome, identified by a sudden worsening of AHF symptoms [63], is one of the most common causes for hospital admission, mainly in aged patients [64]. Guidelines recommend patients should receive temporary intravenous positive inotropic agents, such as adrenergic agonists, including dobutamine, dopamine, and PDE inhibitors such as milrinone [65]. Although there is some evidence that this approach maintains systemic perfusion and preserves end-organ performance, positive inotropic agents have not yet demonstrated improved outcomes in AHF patients in either a hospital or ambulatory setting [66]. Interestingly, the most promising therapeutic target in acute decompensated AHF outside of decongestion with diuresis is the vasodilatory pathway [67], and 6-ND is also a very potent vasodilator [14,15]. However, it is important to note that, so far, the positive inotropic effect induced by 6-ND has been observed only in vitro, and therefore these results need to be validated in both anesthetized and conscious animal models of heart failure.

5. Conclusions

6-ND has potent positive inotropic action, presenting a potential novel therapeutic approach in acute heart failure.

Author Contributions: Conceptualization, J.B.-J. and G.D.N.; Methodology, J.B.-J., L.R.M.-T., A.T.L., R.Á.B.L.-M., R.C., M.O.M., M.E.A.M., E.A. and G.D.N.; Formal analysis, G.D.N.; Investigation, A.T.L. and L.C.D.; Data curation, G.D.N.; Writing—original draft, J.B.-J., E.A. and G.D.N.; Writing—review & editing, E.A. and G.D.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2021/14414-8 (J.B.-J.), 2022/08232-7 (R.C.), 2021/13593-6 (A.T.L.), 2017/15175-1 (E.A.); 2019/16805-4 (G.D.N.). Brazilian Ministry of Health grant 23067.050073/2018-19 (M.O.M. & M.E.A.M.); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 303839/2019-8 (G.D.N.).

Institutional Review Board Statement: The protocols were approved by the local ethics committee (CEUA; Protocol No. 5746-1/2021; 5831-1/2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Charles Nash edited the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interest.

References

- Heitz, A.; Schwartz, J.; Velly, J. β -Adrenoceptors of the human myocardium: Determination of β 1 and β 2 subtypes by radioligand binding. *Br. J. Pharmacol.* **1983**, *80*, 711–717. [\[CrossRef\]](#)
- Juberg, E.N.; Minneman, K.P.; Abel, P.W. β 1- and β 2-adrenoceptor binding and functional response in right and left atria of rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1985**, *330*, 193–202. [\[CrossRef\]](#)
- Vago, T.; Bevilacqua, M.; Dagani, R.; Meroni, R.; Frigeni, G.; Santoli, C.; Norbiato, G. Comparison of rat and human left ventricle beta-adrenergic receptors: Subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *121*, 346–354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yang, J.; Liu, Y.; Fan, X.; Li, Z.; Cheng, Y. A pathway and network review on beta-adrenoceptor signaling and beta blockers in cardiac remodeling. *Heart Fail. Rev.* **2013**, *19*, 799–814. [\[CrossRef\]](#)
- Gauthier, C.; Leblais, V.; Kobzik, L.; Trochu, J.N.; Khandoudi, N.; Bril, A.; Balligand, J.L.; Le Marec, H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 1377–1384. [\[CrossRef\]](#)
- Vandecasteele, G.; Bedioun, I. Investigating cardiac β -adrenergic nuclear signaling with FRET-based biosensors. *Ann. d'Endocrinologie* **2021**, *82*, 198–200. [\[CrossRef\]](#)
- Fu, Q.; Chen, X.; Xiang, Y.K. Compartmentalization of β -adrenergic signals in cardiomyocytes. *Trends Cardiovasc. Med.* **2013**, *23*, 250–256. [\[CrossRef\]](#)
- Marzo, K.P.; Frey, M.J.; Wilson, J.R.; Liang, B.T.; Manning, D.R.; Lanoce, V.; Molinoff, P.B. Beta-adrenergic receptor-G protein-adenylate cyclase complex in experimental canine congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing. *Circ. Res.* **1991**, *69*, 1546–1556. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zaccolo, M. Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 693–697. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Xiang, Y.K. Compartmentalization of β -Adrenergic Signals in Cardiomyocytes. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 231–244. [\[CrossRef\]](#)
- Alousi, A.A.; Stankus, G.P.; Stuart, J.C.; Walton, L.H. Characterization of the Cardiotonic Effects of Milrinone, a New and Potent Cardiac Bipyridine, on Isolated Tissues from Several Animal Species. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1983**, *5*, 804–811. [\[CrossRef\]](#)
- Dage, R.C.; Roebel, E.L.; Hsieh, C.P.; Weiner, D.L.; Woodward, J.K. Cardiovascular properties of a new cardiotonic agent: MDL 17,043 (1,3-dihydro-4-methyl-5-[4-(methylthio)-benzoyl]-2H-imidazol-2-one). *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1982**, *4*, 500–508. [\[CrossRef\]](#)
- Christ, T.; Engel, A.; Ravens, U.; Kaumann, A.J. Cilostamide potentiates more the positive inotropic effects of (–)-adrenaline through β 2-adrenoceptors than the effects of (–)-noradrenaline through β 1-adrenoceptors in human atrial myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2006**, *374*, 249–253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Britto-Júnior, J.; Coelho-Silva, W.C.; Murari, G.F.; Nash, C.E.S.; Mônica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci.* **2021**, *276*, 119425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Britto-Júnior, J.; Campos, R.; Peixoto, M.; Lima, A.T.; Jacintho, F.F.; Mônica, F.Z.; Moreno, R.A.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-Nitrodopamine is an endogenous selective dopamine receptor antagonist in Chelonoidis carbonaria aorta. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2022**, *260*, 109403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Britto-Júnior, J.; Lima, A.; Santos-Xavier, J.; Gonzalez, P.; Mônica, F.; Campos, R.; de Souza, V.; Schenka, A.; Antunes, E.; De Nucci, G. Relaxation of thoracic aorta and pulmonary artery rings of marmosets (*Callithrix* spp.) by endothelium-derived 6-nitrodopamine. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2023**, *56*, e12622. [\[CrossRef\]](#)
- Britto-Júnior, J.; da Silva-Filho, W.P.; Amorim, A.C.; Campos, R.; Moraes, M.O.; Moraes, M.E.A.; Fregonesi, A.; Monica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. *Andrology* **2022**, *10*, 1540–1547. [\[CrossRef\]](#)
- Britto-Júnior, J.; Ximenes, L.; Ribeiro, A.; Fregonesi, A.; Campos, R.; Kiguti, L.R.d.A.; Mônica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *911*, 174544. [\[CrossRef\]](#)
- Britto-Júnior, J.; de Oliveira, M.G.; Gati, C.d.R.; Campos, R.; Moraes, M.O.; Moraes, M.E.A.; Mônica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-Nitrodopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism. *Life Sci.* **2022**, *307*, 120879. [\[CrossRef\]](#)
- Britto-Júnior, J.; Prado, G.L.P.D.; Chiavegatto, S.; Cunha, F.; Moraes, M.O.; Moraes, M.E.A.; Monica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. The importance of the endothelial nitric oxide synthase on the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated atria and ventricles and their role on chronotropism. *Nitric Oxide* **2023**, *138–139*, 26–33. [\[CrossRef\]](#)
- Endoh, M.; Shimizu, T.; Yanagisawa, T. Characterization of adrenoceptors mediating positive inotropic responses in the ventricular myocardium of the dog. *Br. J. Pharmacol.* **1978**, *64*, 53–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflug. Arch.* **1895**, *61*, 291–332. [\[CrossRef\]](#)
- Andersen, M.L. *Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividade de Ensino ou Pesquisa Científica, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*; Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação: Brasília, Brasil, 2016.
- du Sert, N.P.; Hurst, V.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Baker, M.; Browne, W.J.; Clark, A.; Cuthill, I.C.; Dimagli, U.; et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000410. [\[CrossRef\]](#)

25. Ribeiro, O.M.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Lovisolo, S.M.; Zatz, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* **1992**, *20*, 298–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. van Oene, J.C.; Sminia, P.; Mulder, A.H.; Horn, A.S. The purported dopamine agonist DPI inhibits [3H]noradrenaline release from rat cortical slices but not [3H]dopamine and [14C]acetylcholine release from rat striatal slices in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* **1983**, *35*, 786–792. [[CrossRef](#)]
27. Britto-Júnior, J.; Pinheiro, D.H.A.; Justo, A.F.O.; Murari, G.M.F.; Campos, R.; Mariano, F.V.; de Souza, V.B.; Schenka, A.A.; Mónica, F.Z.; Antunes, E.; et al. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2020**, *8*, e00612. [[CrossRef](#)]
28. Campos, R.; Pinheiro, D.H.A.; Britto-Júnior, J.; de Castro, H.A.; Mendes, G.D.; Moraes, M.O.; Moraes, M.E.A.; Lopes-Martins, R.B.; Antunes, N.J.; De Nucci, G. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from Chelonoidis carbonaria aortae in vitro. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2021**, *1173*, 122668. [[CrossRef](#)]
29. Meesters, R.J.; Voswinkel, S. Bioanalytical Method Development and Validation: From the USFDA 2001 to the USFDA 2018 Guidance for Industry. *J. Appl. Bioanal.* **2018**, *4*, 67–73. [[CrossRef](#)]
30. Testai, L.; Martelli, A.; Cristofaro, M.; Breschi, M.C.; Calderone, V. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 750–756. [[CrossRef](#)]
31. Amhold, J.; Monzani, E.; Furtmüller, P.G.; Zederbauer, M.; Casella, L.; Obinger, C. Kinetics and Thermodynamics of Halide and Nitrite Oxidation by Mammalian Heme Peroxidases. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 3801–3811. [[CrossRef](#)]
32. Burner, U.; Furtmüller, P.G.; Kettle, A.J.; Koppenol, W.H.; Obinger, C. Mechanism of Reaction of Myeloperoxidase with Nitrite. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20597–20601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Moreno, H.; Metzke, K.; Bento, A.C.; Antunes, E.; Zatz, R.; Nucci, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res. Cardiol.* **1996**, *91*, 248–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Amrani, M.; O'Shea, J.; Allen, N.J.; Harding, S.E.; Jaäyakumar, J.; Pepper, J.R.; Moncada, S.; Yacoub, M.H. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J. Physiol.* **1992**, *456*, 681–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Preckel, B.; Kojda, G.; Schlack, W.; Ebel, D.; Kottenberg, K.; Noack, E.; Thämer, V. Inotropic Effects of Glyceryl Trinitrate and Spontaneous NO Donors in the Dog Heart. *Circulation* **1997**, *96*, 2675–2682. [[CrossRef](#)]
36. Kojda, G.; Kottenberg, K.; Nix, P.; Schlüter, K.D.; Piper, H.M.; Noack, E. Low Increase in cGMP Induced by Organic Nitrates and Nitrovasodilators Improves Contractile Response of Rat Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **1996**, *78*, 91–101. [[CrossRef](#)]
37. Brady, A.J.; Warren, J.B.; Poole-Wilson, P.A.; Williams, T.J.; Harding, S.E. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1993**, *265*, H176–H182. [[CrossRef](#)]
38. Müller-Strahl, G.; Kottenberg, K.; Zimmer, H.; Noack, E.; Kojda, G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J. Physiol.* **2000**, *522*, 311–320. [[CrossRef](#)]
39. Klabunde, R.E.; Kimber, N.D.; Kuk, J.E.; Helgren, M.C.; Förstermann, U. NGMethyl-L-arginine decreases contractility, cGMP and cAMP in isoproterenol-stimulated rat hearts in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *223*, 1–7. [[CrossRef](#)]
40. Cotton, J.M.; Kearney, M.T.; MacCarthy, P.A.; Grocott-Mason, R.M.; McClean, D.R.; Heymes, C.; Richardson, P.J.; Shah, A.M. Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation* **2001**, *104*, 2318–2323. [[CrossRef](#)]
41. Stamler, J.S.; Loh, E.; Roddy, A.M.; Currie, E.K.; Creager, A.M. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* **1994**, *89*, 2035–2040. [[CrossRef](#)]
42. Gardiner, S.; Compton, A.; Kemp, P.; Bennett, T. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *101*, 625–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Brett, S.E.; Cockcroft, J.R.; Mant, T.G.; Ritter, J.M.; Chowienzyk, P.J. Haemodynamic effects of inhibition of nitric oxide synthase and of L-arginine at rest and during exercise. *J. Hypertens.* **1998**, *16*, 429–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kiely, D.G.; Lee, A.F.C.; Struthers, A.D.; Lipworth, B.J. Nitric oxide: An important role in the maintenance of systemic and pulmonary vascular tone in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *46*, 263–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zivkovic, V.; Djuric, D.; Turjacanin-Pantelic, D.; Marinkovic, Z.; Stefanovic, D.; Srejavic, I.; Jakovljevic, V. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on cardiodynamic parameters and coronary flow in isolated rat hearts. *Exp. Clin. Cardiol.* **2013**, *18*, e102–e110.
46. Rassaf, T.; Poll, L.W.; Brouzos, P.; Lauer, T.; Totzeck, M.; Kleinbongard, P.; Gharini, P.; Andersen, K.; Schulz, R.; Heusch, G.; et al. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur. Heart J.* **2006**, *27*, 1699–1705. [[CrossRef](#)]
47. Brillante, D.G.; O'Sullivan, A.J.; Johnstone, M.T.; Howes, L.G. Predictors of inotropic and chronotropic effects of N G-monomethyl-L-arginine. *Eur. J. Clin. Invest.* **2009**, *39*, 273–279. [[CrossRef](#)]
48. Marck, P.V.; Pierre, S.V. Na/K-ATPase Signaling and Cardiac Pre/Postconditioning with Cardiotonic Steroids. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2336. [[CrossRef](#)]
49. Sukoyan, G.V.; Berberashvili, T.M.; Karsanov, N.V. Submolecular mechanisms underlying in vitro and in vivo effect of cardiac glycosides on contractile activity of myocardial myofibrils during heart failure. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2006**, *141*, 424–426. [[CrossRef](#)]

stored at -20°C until analysis [27]. Basal release of catecholamines was also evaluated from ventricles obtained from animals chronically treated with L-NAME and from ventricles of control animals incubated with either L-NAME (100 μM) or the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX; 1 μM).

2.5. Determination of Catecholamines by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

The catecholamine LC-MS/MS method [28] was modified to allow the measurement of the four catecholamines in a single chromatographic run. The method validation following USFDA guidelines for bioanalytical methods [29] was described elsewhere.

2.6. Isolated Langendorff's Perfused Heart

Heparin (1000 IU/kg) was injected i.p. to prevent blood clotting and euthanasia was performed as described earlier (Section 2.3). Exsanguination was performed to confirm the euthanasia. The chest was opened and the heart was rapidly excised, the ascending aorta was cannulated, and the heart was mounted in a nonrecirculating Langendorff apparatus. The isolated heart was perfused with KHS (pH 7.4, 37°C), equilibrated with carbogen gas mixture (95% O_2 : 5% CO_2) at constant flow (10 mL/min) and maintained 4–10 mm Hg left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) during initial equilibration [30]. A water-filled latex balloon, connected to the pressure transducer (MLT1199 BP Transducer, ADInstruments, Inc., Dunedin, NZ, USA), was inserted into the left ventricle (LV) via the mitral valve. Left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and heart rate (HR) were continuously recorded by a PowerLab System (ADInstruments, Inc., Dunedin, NZ, USA). Left ventricular developed pressure (LVDP) was calculated by the following formula: $\text{LVSP} - \text{LVEDP}$ and expressed in mmHg. Rate pressure product (RPP) was calculated as the product of heart rate (HR) and left ventricular developed pressure (LVDP) as follows: $\text{RPP} = (\text{HR} \times \text{LVDP})$. One heart was used for a single drug and for a single dose. Only hearts that presented a basal heart rate between 250 and 300 bpm were employed in the experiments.

2.7. Langendorff's Perfused Heart Analysis and Experimental Design

Following an equilibration period of at least ten minutes, a single bolus (10 mL) of 6-ND (0.01, 0.1, 1 or 10 pmol), dopamine (1, 10, 100 or 1000 pmol), noradrenaline (1, 10, 100 or 1000 pmol), or adrenaline (1, 10, 100 or 1000 pmol) was injected. One heart was used for a single drug and for a single dose (for the evaluation of the inotropic effect of 0.01 ($n = 5$), 0.1 ($n = 6$), 1 ($n = 6$), and 10 ($n = 6$) pmol of 6-ND, 23 animals were employed).

2.8. Effect of Atenolol Infusion on the Positive Inotropic Effect Induced by Catecholamines

Following an equilibration period of at least ten minutes, a ten-minute (100 mL/min) infusion of atenolol (0.001, 0.01, 0.1 and 1 μM ; final concentration) was performed before the bolus injection of 6-ND (1 pmol), dopamine (10 nmol), noradrenaline (1 nmol), and adrenaline (1 nmol). The heart was monitored for 15 min. One heart was used for a single drug and a single infusion.

2.9. Statistical Analysis

The left ventricular developed pressure (LVDP) was calculated as the difference between the systolic and end-diastolic pressure values, received from the LVDP curve. Left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and heart rate (HR) were continuously recorded by a PowerLab System (ADInstruments, Inc., Dunedin, NZ, USA). Left ventricular developed pressure (LVDP) was calculated by the following formula: $\text{LVSP} - \text{LVEDP}$ and expressed in mmHg. Rate pressure product (RPP) was calculated by the following formula: $\text{HR} \times \text{LVDP}$ and expressed as $\text{beats} \times \text{mmHg} \times \text{min}^{-1}$. The maximal rate of rise of the left ventricular pressure ($+dP/dt_{\text{max}}$) was monitored continuously by a pressure transducer connected to a Pow-

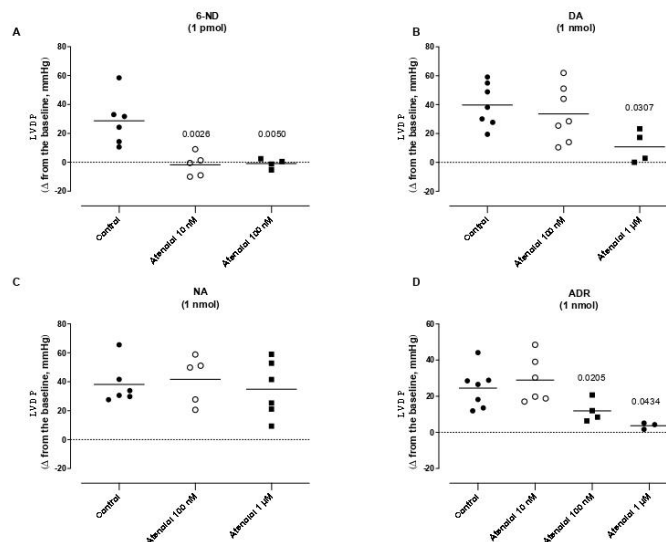


Figure 6. Effect of atenolol infusions (0.01–1 μ M) on the increases in the left ventricle developed pressure (LVDP) induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine (DA), noradrenaline (NA), and adrenaline (ADR). Atenolol (10–100 nM) blocked the increases in the LVDP induced by 6-ND (1 pmol; Panel A). Atenolol (100 nM) had no effect on the increases in the LVDP induced by dopamine (1 nmol; Panel B) and noradrenaline (1 nmol; Panel C), but significantly inhibited the increases in the LVDP induced by adrenaline (1 nmol; Panel D). Atenolol (1 μ M) significantly reduced the increases in the LVDP induced by dopamine (1 nmol; Panel B), noradrenaline (1 nmol; Panel C), and adrenaline (1 nmol; Panel D). ANOVA, followed by Newman–Keuls test. The p values reflect significance compared to control values.

3.7. Effect of Atenolol Infusion on the Increases in dP/dt_{max} Induced by Catecholamines

The infusion of atenolol (10 nM and 100 nM) almost abolished the increases in the dP/dt_{max} induced by 1 pmol of 6-ND (Figure 7A). The infusion of atenolol (100 nM) significantly reduced the increases in the dP/dt_{max} induced by adrenaline (1 nmol; Figure 7D), without affecting those induced by either dopamine (1 nmol; Figure 7B) or noradrenaline (Figure 7C). The infusion of atenolol (1 μ M) significantly reduced the increases in the dP/dt_{max} induced by dopamine (1 nmol; Figure 7B), noradrenaline (1 nmol; Figure 7C), and adrenaline (1 nmol; Figure 7D).

3.8. Effect of Atenolol Infusion on the Increases in the Heart Rate (HR) Induced by Catecholamines

The infusion of atenolol (10 nM and 100 nM) significantly attenuated the increases in the heart rate induced by 1 pmol of 6-ND (Figure 8A). The infusion of atenolol (100 nM) did not alter the increases in the HR induced by dopamine (1 nmol; Figure 8B), noradrenaline (1 nmol; Figure 8C), and adrenaline (Figure 8D). The infusion of atenolol (1 μ M) attenuated the increases in the heart rate induced by dopamine (1 nmol; Figure 8B), noradrenaline (1 nmol; Figure 8C), and adrenaline (Figure 8D).

3.9. Effect of Atenolol Infusion on the Basal LVDP, dP/dt_{max} , HR, and Rate Pressure Product

The infusion of atenolol (10 nM) caused significant reductions in the LVDP (Figure 9A), the dP/dt_{max} (Figure 9B), the basal heart rate (Figure 9C), and the basal rate pressure product (Figure 9D).

had no effect on the increases in the heart rate induced by dopamine (1 nmol; Panel B), noradrenaline (1 nmol; Panel C), and adrenaline (1 nmol; Panel D). Atenolol (1 μ M) caused significant reductions in the increases in the heart rate induced by dopamine (1 nmol; Panel B), noradrenaline (1 nmol; Panel C), and adrenaline (1 nmol; Panel D). ANOVA, followed by Newman–Keuls test. The *p* values reflect significance compared to control values.

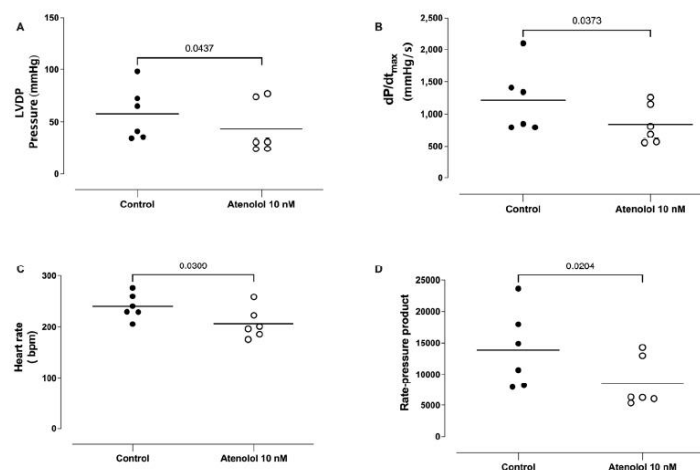


Figure 9. Effect of atenolol on the left ventricular pressure (LVDP), maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max}), heart rate, and rate pressure product (RPP). Atenolol (10 nM) caused significant reductions in the left ventricular developed pressure (LVDP; Panel A), maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt_{max} ; Panel B), heart rate (Panel C), and rate-pressure product (Panel D). Unpaired *t*-test.

4. Discussion

6-ND is released from the whole heart; as it is not only the main catecholamine released from rat isolated ventricles, the results presented here extend our original observation that 6-ND is the major catecholamine released from rat isolated atria [19]. As observed in vascular tissues [14,15], rat and human vas deferens [17,18] and rat isolated atria [19], the basal release is significantly reduced when the tissues are pre-incubated with the NO synthase inhibitor L-NAME; or, in the case of the rat vas deferens, rat isolated atria and rat isolated ventricles (present study) when tissues from L-NAME-chronically-treated rats were employed. 6-ND biosynthesis could be due to either direct nitrosation of dopamine following NO synthesis or to nitrite anion (NO_2^-) oxidation, formed by the degradation of NO to the nitrogen dioxide radical ($NO_2^{\cdot}$), as observed with mammalian heme peroxidases [31] and myeloperoxidase [32]. The finding that 6-ND basal release is significantly decreased in mice isolated atria and ventricles obtained from eNOS^{-/-} mice, but is not reduced in nNOS^{-/-} mouse [20], indicates a non-neurogenic origin in the heart.

The results with Langendorff's preparation demonstrate that 6-ND is a very potent positive inotropic agent, being more potent than dopamine and noradrenaline (one thousand times) and adrenaline (ten thousand times). 6-ND should be considered the most potent endogenous inotropic agent ever reported. Since the synthesis/release of 6-ND from the ventricles is significantly reduced following both acute and chronic inhibition of NO synthase, the finding that rat hearts from chronically L-NAME-treated rats present decreased LVDP is compatible with the major physiological role of 6-ND as a modulator of

heart inotropy; however, those hearts present extensive areas of fibrosis and myocardial necrosis [33], which could contribute to the decreased inotropic response.

The inhibition of NO synthase does cause coronary vasoconstriction [34], and coronary vasoconstriction will decrease myocardial contractility. Whether NO has a direct role in the regulation of cardiac contractility independently of coronary vasoconstriction remains controversial, since it has been characterized as positive [35,36], absent [37], and negative [6] on basal myocardial contractility. Similar to the results here presented, in the rat isolated perfused heart, infusion of the heart with N^W-nitro-L-arginine (L-NNA) provoked relevant decreases in both left ventricular pressure and dP/dt_{max} [38]. The infusion of another NOS inhibitor, N^G-Methyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA), in the rat isolated perfused heart caused an approximately 40% reduction in coronary flow and 60% in cardiac output [34]. In the rat isolated perfused heart stimulated with isoproterenol, infusion of L-NMA caused left ventricular dP/dt_{max} to decrease from 2718 ± 170 to 2070 ± 137 mm Hg/s⁻¹ and left ventricular peak pressure to decrease from 105 ± 9 to 86 ± 5 mm Hg [39]. In vivo, intracoronary infusion of the NOS inhibitor L-NMMA (25 mmol/min) in healthy volunteers caused a significant reduction in basal LV dP/dt_{max} (from 1826 to 1578 mmHg/s; $p < 0.002$), but had no effect on mean aortic pressure or right atrial pressure, indicating that endogenous NO has a positive inotropic effect in the normal human heart [40]. The intravenous infusion of L-NMMA (1 mg/kg/min) caused an increase in the mean blood pressure and significant reductions in both cardiac output and stroke volume by 27.8 ± 2.9% and 15.4 ± 3.5%, respectively [41]. In Long Evans conscious rats, an intravenous bolus injection of L-NAME (10 mg kg⁻¹) provoked important decreases in total cardiac output and stroke volume [42]. Interestingly, in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction, chronic administration of L-NAME did not alter the ejection fraction, although the animals presented signs of congestive heart failure. Indeed, acute or chronic administration of L-NAME is associated with cardio depressive effects [40,43–47].

Although the mechanism responsible for the inotropic action of 6-ND is not known, the finding that it also has positive chronotropic action may provide some clues. For instance, positive inotropic drugs increase the force of myocardial contraction through different pathways. The oldest, cardiac glycoside digoxin, works directly on myocardium and inhibits Na⁺/K⁺-ATPase in the cell membrane [48], resulting in an increase in the intracellular calcium content and its binding to contractile proteins of myofibril [49]. Istaroxime is a novel inotropic agent, structurally not related to cardiac glycosides but with a similar mechanism of action; it also inhibits Na⁺/K⁺-ATPase at the sarcolemma, increasing the intracellular calcium content during systole and improving contractility [50]. It is unlikely that 6-ND acts as an inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase since the use of digoxin is associated with a significant reduction in heart rate [51], and istaroxime, when administered (3 mg/kg/min) to normally conducted sinus rhythm dogs, decreased the heart rate [52].

Levosimendan, a pyridazinone-dinitrile derivative, is a positive inotropic drug with a different mechanism of action. It behaves as a calcium sensitizer, increasing troponin C affinity for Ca²⁺ and stabilizing the troponin C conformation [53]. Levosimendan can increase intracellular calcium due to phosphodiesterase inhibition; however, this does not occur in therapeutic concentrations [54]. The use of levosimendan in severe heart failure patients is associated with an improvement in haemodynamic functions without significant changes in heart rate [55]; while 6-ND has positive chronotropic action, the results obtained here show that 6-ND can have an inotropic effect at dose/concentrations that do not change the heart rate. Whether 6-ND can increase troponin C's affinity for Ca²⁺ remains to be investigated.

Other positive inotropic agents increase cardiac contractility through pathways such as an increase in cyclic AMP levels either by stimulation of adenyl cyclase or by inhibition of type-3 PDE [56]. The PDE3 inhibitors milrinone [57] and cilostazol [58] have positive inotropic and chronotropic effects, and the potency parallels their ability to inhibit PDE3. However, it is unlikely that 6-ND acts as a PDE3 inhibitor since, when incubated in the rat isolated right atrium, it abolishes the concentration-dependent increase in the atrial

50. Khan, H.; Metra, M.; Blair, J.E.A.; Vogel, M.; Harinstein, M.E.; Filippatos, G.S.; Sabbah, H.N.; Porchet, H.; Valentini, G.; Gheorghiadu, M. Istaroxime, a first in class new chemical entity exhibiting SERCA-2 activation and Na-K-ATPase inhibition: A new promising treatment for acute heart failure syndromes? *Heart Fail. Rev.* **2009**, *14*, 277–287. [\[CrossRef\]](#)
51. Patocka, J.; Nepovimova, E.; Wu, W.; Kuca, K. Digoxin: Pharmacology and toxicology—A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *79*, 103400. [\[CrossRef\]](#)
52. Bossu, A.; Kostense, A.; Beekman, H.D.; Houtman, M.J.; van der Heyden, M.A.; Vos, M.A. Istaroxime, a positive inotropic agent devoid of proarrhythmic properties in sensitive chronic atrioventricular block dogs. *Pharmacol. Res.* **2018**, *133*, 132–140. [\[CrossRef\]](#)
53. Pathak, A.; Lebrin, M.; Vaccaro, A.; Senard, J.M.; Despas, F. Pharmacology of levosimendan: Inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2013**, *38*, 341–349. [\[CrossRef\]](#)
54. Szilágyi, S.; Pollesello, P.; Levijoki, J.; Kaheinen, P.; Haikala, H.; Édes, I.; Papp, Z. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *486*, 67–74. [\[CrossRef\]](#)
55. Despas, F.; Trouillet, C.; Franchitto, N.; Labrunee, M.; Galinier, M.; Senard, J.-M.; Pathak, A. Levosimendan improves hemodynamics functions without sympathetic activation in severe heart failure patients: Direct evidence from sympathetic neural recording. *Acute Card. Care* **2009**, *12*, 25–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Honerjager, P. Pharmacology of positive inotropic phosphodiesterase III inhibitors. *Eur. Heart J.* **1989**, *10*, 25–31. [\[CrossRef\]](#)
57. Overgaard, C.B.; Džavik, V. Inotropes and Vasopressors: Review of Physiology and Clinical Use in Cardiovascular Disease. *Circulation* **2008**, *118*, 1047–1056. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Cone, J.; Wang, S.; Tandon, N.; Fong, M.; Sun, B.; Sakurai, K.; Yoshitake, M.; Kambayashi, J.-I.; Liu, Y. Comparison of the Effects of Cilostazol and Milrinone on Intracellular cAMP Levels and Cellular Function in Platelets and Cardiac Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *34*, 497–504. [\[CrossRef\]](#)
59. Britto-Júnior, J.; Lima, A.T.; Fuguhara, V.; Monica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. Investigation on the positive chronotropic action of 6-nitrodopamine in the rat isolated atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2023**, *396*, 1279–1290. [\[CrossRef\]](#)
60. Nash, C.E.S.; Antunes, N.J.; Coelho-Silva, W.C.; Campos, R.; De Nucci, G. Quantification of cyclic AMP and cyclic GMP levels in Krebs-Henseleit solution by LC-MS/MS: Application in washed platelet aggregation samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2022**, *1211*, 123472. [\[CrossRef\]](#)
61. Lefkowitz, R.J.; Rockman, H.A.; Koch, W.J. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation* **2000**, *101*, 1634–1637. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Motiejunaite, J.; Amar, L.; Vidal-Petiot, E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann. d'Endocrinologie* **2020**, *82*, 193–197. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Ponikowski, P.; Voors, A.A.; Anker, S.D.; Bueno, H.; Cleland, J.G.F.; Coats, A.J.S.; Falk, V.; González-Juanatey, J.R.; Harjola, V.-P.; Jankowska, E.A.; et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart. J.* **2016**, *37*, 2129–2200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Sinnenberg, L.; Givertz, M.M. Acute heart failure. *Trends Cardiovasc. Med.* **2020**, *30*, 104–112. [\[CrossRef\]](#)
65. Yancy, C.W.; Jessup, M.; Bozkurt, B.; Butler, J.; Casey, D.E., Jr.; Drazner, M.H.; Fonarow, G.C.; Geraci, S.A.; Horwich, T.; Januzzi, J.L.; et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: Executive summary: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* **2013**, *128*, 1810–1852. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. The Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group. Xamoterol in severe heart failure. *Lancet* **1990**, *336*, 1–6, Erratum in *Lancet* **1990**, *336*, 698. [\[CrossRef\]](#)
67. Njoroge, J.N.; Teerlink, J.R. Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Acute Decompensated Heart Failure. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 1468–1486. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4. DISCUSSÃO

6-ND é liberada de todo o coração; pois não é apenas a principal catecolamina liberada dos ventrículos isolados de ratos, os resultados apresentados, aqui, estendem nossa observação original de que 6-ND é a principal catecolamina liberada dos átrios isolados de ratos. Conforme observado em tecidos vasculares, vasos deferentes de ratos e humanos e em átrios isolados de ratos, a liberação basal é significativamente reduzida quando os tecidos são pré-incubados com o inibidor da sintase de NO, L-NAME; ou, no caso dos vasos deferentes de ratos, átrios isolados de ratos e ventrículos isolados de ratos (estudo atual), quando tecidos de ratos tratados cronicamente com L-NAME foram utilizados. A biossíntese de 6-ND pode-se dever tanto à nitrosação direta da dopamina após a síntese de NO quanto à oxidação do ânion nitrito (NO_2^-) formado pela degradação do NO ao radical do dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$), conforme observado em peroxidases da heme de mamíferos e mieloperoxidase. A descoberta de que a liberação basal de 6-ND é significativamente reduzida em átrios e ventrículos isolados de camundongos obtidos de camundongos eNOS $^{-/-}$, mas não é reduzida em camundongos nNOS $^{-/-}$, indica uma origem não neurogênica no coração.

Os resultados com a preparação de Langendorff demonstram que 6-ND é um agente inotrópico positivo muito potente, sendo mais potente que a dopamina e a noradrenalina (mil vezes) e a adrenalina (dez mil vezes). 6-ND deve ser considerado o agente inotrópico endógeno mais potente já relatado. Uma vez que a síntese/liberação de 6-ND dos ventrículos é significativamente reduzida após a inibição aguda e crônica da NO sintase, a descoberta de que os corações de ratos tratados cronicamente com L-NAME apresentam a diminuição do LVDP é compatível com o principal papel fisiológico do 6-ND como modulador da inotropia cardíaca; entretanto, esses corações apresentam extensas áreas de fibrose e necrose miocárdica, o que poderia contribuir para a diminuição da resposta inotrópica.

A inibição da enzima óxido nítrico sintase causa vasoconstrição coronariana⁶², e a vasoconstrição coronariana diminuirá a contratilidade miocárdica. Se o NO tem um papel direto na regulação da contratilidade cardíaca

independentemente da vasoconstrição coronariana ainda é controverso, já que foi caracterizado como positivo^{63,64}, ausente⁶⁵ e negativo⁶⁶ na contratilidade miocárdica basal.

Similar aos resultados aqui apresentados, no coração isolado perfundido de rato, a infusão do coração com NW-nitro-L-arginina (L-NNA) provocou reduções relevantes tanto na pressão ventricular esquerda como no dP/dt_{max} ⁶⁷. A infusão de outro inibidor da NOS, sal de acetato de NG-Metil-L-arginina (L-NMMA), no coração isolado perfundido de rato causou uma redução de, aproximadamente, 40% no fluxo coronariano e 60% no débito cardíaco⁶².

No coração isolado perfundido de rato estimulado com isoproterenol, a infusão de L-NMA fez com que o dP/dt_{max} do ventrículo esquerdo diminuísse de 2718 ± 170 para 2070 ± 137 mmHg/s⁻¹ e a pressão máxima do ventrículo esquerdo diminuísse de 105 ± 9 para 86 ± 5 mmHg⁶⁸. *In vivo*, a infusão intracoronariana do inibidor da NOS L-NMMA (25 mmol/min) em voluntários saudáveis causou uma redução significativa no dP/dt_{max} do VE basal (de 1826 para 1578 mmHg/s; $p < 0,002$), mas não teve efeito sobre a pressão média aórtica ou a pressão atrial direita, indicando que o NO endógeno tem um efeito inotrópico positivo no coração humano normal⁶⁹.

A infusão intravenosa de L-NMMA (1 mg/kg/min) causou um aumento na pressão sanguínea média e reduções significativas tanto no débito cardíaco quanto no volume sistólico em $27,8 \pm 2,9\%$ e $15,4 \pm 3,5\%$, respectivamente⁷⁰. Em ratos conscientes Long Evans, uma injeção intravenosa de bolo de L-NAME (10 mg kg⁻¹) provocou diminuições importantes no débito cardíaco total e no volume sistólico⁷¹. Curiosamente, em um modelo de camundongo de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada, a administração crônica de L-NAME não alterou a fração de ejeção, embora os animais apresentassem sinais de insuficiência cardíaca congestiva. De fato, a administração aguda ou crônica de L-NAME está associada a efeitos cardio depressivos^{69,72-76}.

Apesar de o mecanismo responsável pela ação inotrópica do 6-ND não ser conhecido, a descoberta de que também possui ação cronotrópica positiva pode fornecer algumas pistas. Por exemplo, drogas inotrópicas positivas aumentam a força da contração miocárdica por meio de diferentes vias. A mais antiga, digoxina (um glicosídeo cardíaco), age diretamente no miocárdio e inibe

a Na⁺/K⁺-ATPase na membrana celular⁷⁷, resultando em um aumento no conteúdo intracelular de cálcio e sua ligação a proteínas contráteis da miofibrila⁷⁸. Istaroxima é um novo agente inotrópico, estruturalmente não relacionado aos glicosídeos cardíacos, mas com um mecanismo de ação semelhante; ele também inibe a Na⁺/K⁺-ATPase na sarcolema, aumentando o conteúdo intracelular de cálcio durante a sístole e melhorando a contratilidade⁷⁹. É improvável que 6-ND atue como um inibidor de Na⁺/K⁺-ATPase, uma vez que o uso de digoxina está associado a uma redução significativa na frequência cardíaca⁸⁰, e istaroxima, quando administrada (3 mg/kg/min) em cães com ritmo sinusal normal, diminuiu a frequência cardíaca⁸¹.

Levosimendana, um derivado de piridazinona-dinitrilo, é uma droga inotrópica positiva com um mecanismo de ação diferente. Ela age como um sensibilizador de cálcio, aumentando a afinidade da troponina C pelo Ca²⁺ e estabilizando a conformação da troponina C⁸². Levosimendana pode aumentar o cálcio intracelular devido à inibição da fosfodiesterase; no entanto, isso não ocorre em concentrações terapêuticas⁸³. O uso de levosimendana em pacientes com insuficiência cardíaca grave está associado a uma melhora nas funções hemodinâmicas sem alterações significativas na frequência cardíaca⁸⁴; enquanto 6-ND possui ação cronotrópica positiva, os resultados obtidos, aqui, mostram que 6-ND pode ter um efeito inotrópico em doses/concentrações que não alteram a frequência cardíaca. Se 6-ND pode aumentar a afinidade da troponina C pelo Ca²⁺ ainda precisa ser investigado.

Outros agentes inotrópicos positivos aumentam a contratilidade cardíaca por meio de vias como o aumento dos níveis de AMP cíclico, seja por estimulação da adenilil ciclase ou pela inibição da PDE tipo 3⁸⁵. Os inibidores da PDE3 milrinone⁸⁶ e cilostazol⁸⁷ têm efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos, e a potência está relacionada à capacidade de inibir a PDE3. No entanto, é improvável que 6-ND atue como um inibidor da PDE3, pois, quando incubado no átrio direito isolado de rato, ele abole o aumento dependente da concentração na frequência atrial induzida por milrinone ou cilostazol⁸⁸. Além disso, a incubação do 6-ND com plaquetas lavadas humanas não foi acompanhada por alterações nos níveis de nucleotídeos⁸⁹.

A estimulação do receptor β_1 em miócitos ventriculares ativa a adenilil ciclase-Gs-cAMP-proteína quinase A (PKA), com consequente fosforilação de substratos da PKA, incluindo canal de cálcio do tipo L, troponina I cardíaca e proteína de ligação da miosina cardíaca C, causando um aumento nos transientes de cálcio e na contratilidade⁹⁰. Em células marca-passo, a fosforilação por PKA dos canais iônicos da membrana aumenta o ciclo de cálcio e a frequência de marca-passo. Assim, a ativação dos β_1 -adrenoreceptores por catecolaminas é responsável pelo efeito inotrópico positivo⁹¹. É interessante observar que antagonistas seletivos dos receptores β_1 -adrenérgicos, como atenolol, betaxolol e metoprolol, reduzem a frequência atrial em concentrações que bloqueiam seletivamente os aumentos na frequência atrial induzidos por 6-ND, indicando que a redução na frequência cardíaca induzida por antagonistas dos β_1 -adrenoreceptores pode ser devida à inibição específica do receptor 6-ND, e não ao β_1 -adrenoreceptor³¹. De fato, o mesmo fenômeno foi observado aqui, onde atenolol induziu um efeito inotrópico negativo na mesma concentração que afetou o efeito inotrópico positivo de 6-ND, mas não alterou o efeito inotrópico positivo induzido pelas catecolaminas clássicas. A descoberta de que o atenolol apresenta um efeito inotrópico negativo em concentrações que afetam seletivamente o efeito inotrópico positivo de 6-ND reforça o conceito de que 6-ND desempenha um papel modulador importante na inotropia cardíaca.

Embora o mecanismo pelo qual 6-ND causa um efeito inotrópico e cronotrópico positivo no coração isolado de rato não seja claro, a potência notável desta nova catecolamina endógena apresenta interessantes possibilidades terapêuticas, principalmente na insuficiência cardíaca aguda (ICA). Esta síndrome clínica, identificada por uma piora súbita dos sintomas da ICA⁹², é uma das causas mais comuns de internação hospitalar, principalmente em pacientes idosos

5-CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a 6-nitrodopamina é o agente endógeno mais potente em termos de inotropismo positivo no coração isolado de rato. Esses resultados podem ter implicações importantes na compreensão dos mecanismos de regulação da função cardíaca e podem abrir novas oportunidades para o desenvolvimento de terapias direcionadas a doenças cardíacas.

6. REFERÊNCIAS

- 1- Alexopoulos GS. Mechanisms and treatment of late-life depression. *Transl Psychiatry*. 2019; 5;9(1):188. doi: 10.1038/s41398-019-0514-6.

- 2- Lakatta EG. Catecholamines and cardiovascular function in aging. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1987;16(4):877-91.

- 3- Molinoff PB, Axelrod, J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*. 1971; 40:465-500. doi: 10.1146/annurev.bi.40.070171.002341.

- 4- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(3):331-49. doi: 10.1124/pr.56.3.1.

- 5- Nagatsu T. Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci Res*. 1991;12(2):315-45. doi: 10.1016/0168-0102(91)90001-f.

- 6- Gilsbach R, Hein L. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br J Pharmacol*. 2012;165(1):90-102. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01533.x.

- 7- Smeets WJ, González A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000; 33(2-3):308-79. doi: 10.1016/s0165-0173(00)00034-5.

- 8- Gilsbach R, Hein L. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors, respectively? *Br J Pharmacol*. 2012;165(1):90-102. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01533.x.

9- Richter D. Adrenaline and amine oxidase. *Biochem J.* 1937; 31(11):2022-8. doi: 10.1042/bj0312022.

10- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(3):331-49. doi: 10.1124/pr.56.3.1.

11- Kopin IJ, Rundqvist B, Friberg P, Lenders J, Goldstein DS, Eisenhofer G. Different relationships of spillover to release of norepinephrine in human heart, kidneys, and forearm. *Am J Physiol.* 1998; 275(1):R165-73. doi: 10.1152/ajpregu.1998.275.1.R165. Erratum in: *Am J Physiol* 1998; 275(3 Pt 2).

12- Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl.* 2006; (70):9-15. doi: 10.1007/978-3-211-45295-0_3.

13- Hornykiewicz O. The action of dopamine on the arterial blood pressure of the guinea-pig. *Br J Pharmacol Chemother.* 1958; 13(1):91-4. doi: 10.1111/j.1476-5381.1958.tb00197.x.

14- Carlsson A. Detection and assay of dopamine. *Pharmacol Rev.* 1959; 11(2, Part 2):300-4.

15- Costa KM, Schoenbaum G. Dopamine. *Curr Biol.* 2022; 8;32(15):R817-R824. doi: 10.1016/j.cub.2022.06.060.

16- Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2007; 112(12):583-97. doi: 10.1042/CS20070018.

17- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011; 63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642.

- 18- Hornykiewicz O. [Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1962; 7;87:1807-10.
- 19- Sibley DR, Monsma FJ Jr. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13(2):61-9. doi: 10.1016/0165-6147(92)90025-2.
- 20- Hornykiewicz O. L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids.* 2002; 23(1-3):65-70. doi: 10.1007/s00726-001-0111-9.
- 21- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78(1):189-225. doi: 10.1152/physrev.
- 22- Shintani F, Kinoshita T, Kanba S, Ishikawa T, Suzuki E, Sasakawa N, Kato R, Asai M, Nakaki T. Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain. *J Biol Chem.* 1996; 7;271(23):13561-5. doi: 10.1074/jbc.271.23.13561.
- 23- Palumbo A, Napolitano A, Barone P, d'Ischia M. Nitrite- and peroxide-dependent oxidation pathways of dopamine: 6-nitrodopamine and 6-hydroxydopamine formation as potential contributory mechanisms of oxidative stress- and nitric oxide-induced neurotoxicity in neuronal degeneration. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12(12):1213-22. doi: 10.1021/tx990121g.
- 24- Tsunoda M, Uchino E, Imai K, Hayakawa K, Funatsu T. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. *J Chromatogr A.* 2007; 14;1164(1-2):162-6. doi: 10.1016/j.chroma.2007.07.005.
- 25- Chiari A, Li XH, Xu Z, Pan HL, Eisenach JC. Formation of 6-nitronorepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role

in spinal analgesia. *Neuroscience*. 2000; 101(1):189-96. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00328-6.

26- Britto-Júnior J, Coelho-Silva WC, Murari GF, Serpellone Nash CE, Mónica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci*. 2021; 1;276:119425. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119425.

27- de Oliveira LFG, Britto-Júnior J, Lima AT, Moraes MO, Moraes MEA, de Souza VB, Schenka AA, Monica FZ, De Nucci G. Release of 6-nitrodopamine from human popliteal artery and vein. *Life Sci*. 2023; 1;326:121801. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121801.

28- Campos R, Pinheiro DHA, Britto-Júnior J, de Castro HA, Mendes GD, Moraes MO, et al. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from *Chelonoidis carbonaria* aortae in vitro. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2021; 22;1173:122668. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122668.

29- Lima AT, Dos Santos EX, Britto-Júnior J, de Souza VB, Schenka AA, Campos R, et al. Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of *Pantherophis guttatus* aortic rings. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2022; 262:109471. doi: 10.1016/j.cbpc.2022.109471.

30- Britto-Júnior J, Guimarães RAB, Oliveira DL, Lima AT, Quirino Junior G, de Oliveira Stocco GA, et al. Alpha1-adrenergic blockers selectively antagonize the contractions induced by 6-nitrodopamine in the human vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2023; 1. doi: 10.1007/s00210-023-02805-x.

31- Britto-Júnior J, de Oliveira MG, Dos Reis Gati C, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, et al. 6-NitroDopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism. *Life Sci*. 2022; 15;307:120879. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120879.

32- Britto-Júnior J, Pereira do Prado GL, Chiavegatto S, Cunha F, Moraes MO, Moraes MEA, et al. The importance of endothelial nitric oxide synthase on the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated atria and ventricles and their role in chronotropism. *Nitric Oxide*. 2023; 1;138-139:26-33. doi: 10.1016/j.niox.2023.06.001.

33- Júnior GQ, Britto-Júnior J, Magalhaes TB, Campos R, Nyamkondiwa KL, Klugh KL, et al. Measurement of 6-cyanodopamine, 6-nitrodopa, 6-nitrodopamine, and 6-nitroadrenaline by LC-MS/MS in Krebs-Henseleit solution. Assessment of basal release from rabbit isolated right atrium and ventricles. *Biomed Chromatogr*. 2023; 37(9):e5691. doi: 10.1002/bmc.5691.

34- Britto-Júnior J, Ximenes L, Ribeiro A, Fregonesi A, Campos R, et al. 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *Eur J Pharmacol*. 2021; 15;911:174544. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174544.

35- Britto-Júnior J, da Silva-Filho WP, Amorim AC, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, et al. 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. *Andrology*. 2022; 10(8):1540-1547. doi: 10.1111/andr.13263.

36- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 27;288(5789):373-6. doi: 10.1038/288373a0. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 27;288(5789):373-6. doi: 10.1038/288373a0.

37- Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras*. 2002;17(6):417–23. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>

38- Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science*. 1992; 18;258(5090):1861. doi: 10.1126/science.1470903.

- 39- Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 1993; 1;7(2):349-60. doi: 10.1096/fasebj.7.2.8440411.
- 40- Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100(5):567-75. doi: 10.1093/ajcp/100.5.567.
- 41- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12):3051-64.
- 42- Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc.* 1996; 1;209(7):1297-302.
- 43- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43(2):109-42.
- 44- Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100(5):567-75. doi: 10.1093/ajcp/100.5.567.
- 45- Wennmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Intern Med.* 1994; 235(4):317-27. doi: 10.1111/j.1365-2796.1994.tb01081.x.
- 46- Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg.* 1995; 82(12):1598-610. doi: 10.1002/bjs.1800821206.
- 47- Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis.* 1996; 55(1):7-20. doi: 10.1136/ard.55.1.
- 48- Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100(5):567-75. doi: 10.1093/ajcp/100.5.567.
- 49- Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.* 1995; 221(3):220-35. doi: 10.1097/00000658-199503000-00003.

- 50- Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*. 1992; 4;70(5):705-7. doi: 10.1016/0092-8674(92)90301-r.
- 51- Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol*. 1995;60:323-71. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60589-1.
- 52- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992; 18;258(5090):1898-902. doi: 10.1126/science.1281928
- 53- Conger JD. Endothelial regulation of vascular tone. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1994;15;29(10):117-22, 125-6. doi: 10.1080/21548331.1994.11443095.
- 54- Gibaldi M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J Clin Pharmacol*. 1993; 33(6):488-96. doi: 10.1002/j.1552-4604.1993.tb04694.x.
- 55- Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001; 27;88(8):756-62. doi: 10.1161/hh0801.089861.
- 56- Barrachina MD, Panés J, Esplugues JV. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drug development. *Curr Pharm Des*. 2001; 7(1):31-48. doi: 10.2174/1381612013398491.
- 57- Shapira S, Kadar T, Weissman BA. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res*. 1994; 30;668(1-2):80-4. doi: 10.1016/0006-8993(94)90513-4.
- 58- Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*. 2000; 50(1-2):139-48. doi: 10.1023/a:1006431309841.
- 59- Wong GK, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11(1):215-20. doi: 10.1093/ndt/11.1.215.

60- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23(6 Pt 2):1121-31. doi: 10.1161/01.hyp.23.6.1121.

61- Murrell GA, Doland MM, Jang D, Szabo C, Warren RF, Hannafin JA. Nitric oxide: an important articular free radical. *J Bone Joint Surg Am*. 1996 Feb;78(2):265-74.

62- Amrani M, O'Shea J, Allen NJ, Harding SE, Jayakumar J, Pepper JR, et al. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol*. 1992 Oct;456:681-7. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019361.

63- Preckel B, Kojda G, Schlack W, Ebel D, Kottenberg K, Noack E, et al. Inotropic effects of glyceryl trinitrate and spontaneous NO donors in the dog heart. *Circulation*. 1997; 21;96(8):2675-82. doi: 10.1161/01.cir.96.8.2675.

64- Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter KD, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996; 78(1):91-101. doi: 10.1161/01.res.78.1.91.

65- Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol*. 1993; 265(1 Pt 2):H176-82. doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.1.H176.

66- Vandecasteele G, Bedioun I. Investigating cardiac β -adrenergic nuclear signaling with FRET-based biosensors. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2021; 82(3-4):198-200. doi: 10.1016/j.ando.2020.04.001.

67- Müller-Strahl G, Kottenberg K, Zimmer HG, Noack E, Kojda G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J Physiol.* 2000; 15;522 Pt 2(Pt 2):311-20. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00311.x.

68- Klabunde RE, Kimber ND, Kuk JE, Helgren MC, Förstermann U. NG-methyl-L-arginine decreases contractility, cGMP and cAMP in isoproterenol-stimulated rat hearts in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1992; 13;223(1):1-7. doi: 10.1016/0014-2999(92)90810-q.

69- Cotton JM, Kearney MT, MacCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation.* 2001; 6;104(19):2318-23. doi: 10.1161/hc4401.098515.

70- Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation.* 1994; 89(5):2035-40. doi: 10.1161/01.cir.89.5.2035.

71- Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol.* 1990;101(3):625-31. doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb14131.x.

72- Brett SE, Cockcroft JR, Mant TG, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Haemodynamic effects of inhibition of nitric oxide synthase and of L-arginine at rest and during exercise. *J Hypertens.* 1998;16(4):429-35. doi: 10.1097/00004872-199816040-00004.

73- Kiely DG, Lee AF, Struthers AD, Lipworth BJ. Nitric oxide: an important role in the maintenance of systemic and pulmonary vascular tone in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1998; 46(3):263-6. doi: 10.1046/j.1365-2125.1998.00767.x.

74- Zivkovic V, Djuric D, Turjacanin-Pantelic D, Marinkovic Z, Stefanovic D, Srejavic I, et al. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on cardiodynamic parameters and coronary flow in isolated rat hearts. *Exp Clin Cardiol*. 2013;18(2):e102-10.

75- Rassaf T, Poll LW, Brouzos P, Lauer T, Totzeck M, Kleinbongard P, et al. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J*. 2006; 27(14):1699-705. doi: 10.1093/eurheartj/ehl096.

76- Brillante DG, O'Sullivan AJ, Johnstone MT, Howes LG. Predictors of inotropic and chronotropic effects of NG-monomethyl-L-arginine. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39(4):273-9. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02097.x.

77- Marck PV, Pierre SV. Na/K-ATPase Signaling and Cardiac Pre/Postconditioning with Cardiotonic Steroids. *Int J Mol Sci*. 2018; 9;19(8):2336. doi: 10.3390/ijms19082336.

78- Sukoyan GV, Berberashvili TM, Karsanov NV. Submolecular mechanisms underlying in vitro and in vivo effect of cardiac glycosides on contractile activity of myocardial myofibrils during heart failure. *Bull Exp Biol Med*. 2006; 141(4):424-6. doi: 10.1007/s10517-006-0189-x.

79- Khan H, Metra M, Blair JE, Vogel M, Harinstein ME, Filippatos GS, et al. Istaroxime, a first in class new chemical entity exhibiting SERCA-2 activation and Na-K-ATPase inhibition: a new promising treatment for acute heart failure syndromes? *Heart Fail Rev*. 2009; 14(4):277-87. doi: 10.1007/s10741-009-9136-Z.

80- Patocka J, Nepovimova E, Wu W, Kuca K. Digoxin: Pharmacology and toxicology-A review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020; 79:103400. doi: 10.1016/j.etap.2020.103400.

- 81- Bossu A, Kostense A, Beekman HDM, Houtman MJC, van der Heyden MAG, Vos MA. Istroxime, a positive inotropic agent devoid of proarrhythmic properties in sensitive chronic atrioventricular block dogs. *Pharmacol Res.* 2018; 133:132-140. doi: 10.1016/j.phrs.2018.05.001.
- 82- Pathak A, Lebrin M, Vaccaro A, Senard JM, Despas F. Pharmacology of levosimendan: inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects. *J Clin Pharm Ther.* 2013; 38(5):341-9. doi: 10.1111/jcpt.12067.
- 83- Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, et al. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 2004; 13;486(1):67-74. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.12.005.
- 84- Despas F, Trouillet C, Franchitto N, Labrunee M, Galinier M, Senard JM, et al. Levosimendan improves hemodynamics functions without sympathetic activation in severe heart failure patients: direct evidence from sympathetic neural recording. *Acute Card Care.* 2010; 12(1):25-30. doi: 10.3109/17482940903434077.
- 85-Honerjäger P. Pharmacology of positive inotropic phosphodiesterase III inhibitors. *Eur Heart J.* 1989; 10 Suppl C:25-31. doi: 10.1093/eurheartj/10.suppl_c.25.
- 86- Overgaard CB, Dzavík V. Inotropes and vasopressors: review of physiology and clinical use in cardiovascular disease. *Circulation.* 2008; 2;118(10):1047-56. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728840.
- 87- Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, et al. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 34(4):497-504. doi: 10.1097/00005344-199910000-00004.

88- Britto-Júnior J, Lima AT, Fuguhara V, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. Investigation on the positive chronotropic action of 6-nitrodopamine in the rat isolated atria. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2023; 396(6):1279-1290. doi: 10.1007/s00210-023-02394-9.

89- Nash CES, Antunes NJ, Coelho-Silva WC, Campos R, De Nucci G. Quantification of cyclic AMP and cyclic GMP levels in Krebs-Henseleit solution by LC-MS/MS: Application in washed platelet aggregation samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2022; 15;1211:123472. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123472.

90- Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation*. 2000; 11;101(14):1634-7. doi: 10.1161/01.cir.101.14.1634.

91- Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2021; 82(3-4):193-197. doi: 10.1016/j.ando.2020.03.012.

92- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016; 69(12):1167. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rec.2016.11.005.

ANEXOS

Anexo 1- Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CARTA DE SOLICITAÇÃO – INCLUSÃO DE NOVO(S) MEMBRO(S) EXECUTOR(ES)

À CEUA/UNICAMP,

Eu, Gilberto De Nucci, pesquisador responsável pelo protocolo CEUA/UNICAMP de número:

6087-1/2022, Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knockout eNos,

6067-1/2022, Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knockout iNos,

5959-1/2022, Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knockout nNos,

5746-1/2021, Avaliação da ação fisiológica in vivo e in vitro de receptores alfa-adrenérgicos em ratos Wistar,

5831-1/2021, Avaliação da ação fisiológica e farmacológica in vivo e in vitro de receptores nitrodopamina em ratos Wistar tratado com L-NAME cronicamente, cujo(s) executor(es) são Prof.Dr .Gilberto De Nucci e José Britto Júnior, solicito à CEUA/UNICAMP a inclusão de novo(s) membro(s) executor(es), Samuel Goulart Nacácio e Silva, RA 118659 e Lincoln Rangel de Medeiros Teixeira, RA 219199

Justificativa para a inclusão dos novos membros executores:

O Projeto acima faz parte dos seu projeto de pesquisa de mestrado de ambos os alunos

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 80
13083-970 Campinas, SP – Brasil

https://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal

Telefone: (19) 3521 – 6359
E-mail: comisib@unicamp.br



CEUA/Unicamp

Declaro que não houve/haverá qualquer alteração em relação ao tipo de animais utilizados, número total, grupos e procedimentos experimentais originalmente enviados e aprovados pela CEUA/UNICAMP.

Pesquisador Responsável

Informação importante:

- O(s) certificado(s) de realização de curso de manipulação animal e legislação do(s) novo(s) executor(es) deve(m) ser encaminhado(s) juntamente com esta solicitação.

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 80
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521 – 6359
E-mail: comisib@unicamp.br

https://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal