

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA**

**EFEITOS DAS ENDOTELINAS NA VESÍCULA BILIAR**  
**ISOLADA DE COBAIA**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Farmacologia.**

**Prof. Orientador: Dr. Giles Alexander Rae**

**ALCÍBIA HELENA DE AZEVEDO MAIA CARDOZO**

Florianópolis


1996

# EFEITOS DAS ENDOTELINAS NA VESÍCULA BILIAR DE COBAIA

POR

ALCÍBIA HELENA DE AZEVEDO MAIA CARDOZO

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:




---

Prof. Dr. Giles Alexander Rae



---

Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes



---

Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis, fevereiro de 1996.

*Aos meus pais, Ivo Maia e  
Antônia de Azevedo Maia (in memoriam)  
pela formação.  
Ao Flávio, meu marido, pelo incentivo e constante apoio.  
Aos meus filhos, Rodrigo e Camila.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela orientação, amizade e estímulo ao meu trabalho.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia - UFSC, especialmente ao Dr. João B. Calixto pelo constante incentivo à pesquisa e à Dra. Yara S. Medeiros pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Pedro D'Orléans-Juste, pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pelo carinho e auxílio, de modo especial à Rosane Ostrosky e Paulo Roberto Cardoso.

A Adair Santos, Cláudio Guimarães, Jonny Maas, Jorge Schmaedecke e Josane Reischl, pela amizade e assessoria.

A Valdecir e a Anna Paula pelo excelente relacionamento e agradável clima de trabalho.

Às colegas da Pós-Graduação pela troca de informações e amizade, Daniela Cabrini, Elizabeth Wazlawik, Monique Gevaerd e Zulma Vaz.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
<b>3.1 - Animais</b> .....	20
<b>3.2 - Montagem das preparações</b> .....	20
<b>3.3 - Procedimento experimental</b> .....	23
<b>3.4 - Análise estatística</b> .....	27
<b>3.5 - Drogas</b> .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
<b>4.1 - Comparação dos efeitos contráteis da endotelina-1         e de outros agonistas</b> .....	30
<b>4.2 - Mecanismos de ação contrátil da endotelina-1</b> .....	34
<b>4.3 - Comparação dos efeitos de agonistas de receptores endotelinérgicos</b> ....	36
<b>4.4 - Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos</b> .....	39
<b>4.5 - Efeitos da big-ET-1, big-ET-2 e big-ET-3 na vesícula biliar de cobaia</b> ..	46

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Estrutura das endotelinas-1, -2 e -3 e da sarafotoxina S6c.....	2
<b>FIGURA 2</b> - Esquema da biossíntese da endotelina-1 .....	3
<b>FIGURA 3</b> - Registro isométrico típico dos efeitos contráteis induzidos pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de endotelina-1 na vesícula biliar isolada de cobaia .....	31
<b>FIGURA 4</b> - Curvas concentração-resposta médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, colecistocinina (26-33), carbacol e histamina na vesícula biliar isolada de cobaia .....	32
<b>FIGURA 5</b> - Influências da nicardipina, remoção de cálcio da solução fisiológica, indometacina ou ibuprofeno na reatividade de tiras de vesícula biliar isolada de cobaia à endotelina-1. ....	35
<b>FIGURA 6</b> - Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3, sarafotoxina S6c e IRL 1620 na vesícula biliar isolada de cobaia .....	37
<b>FIGURA 7</b> - Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos sobre os efeitos contráteis da endotelina-1 e os efeitos relaxantes (vasodilatadores) da sarafotoxina S6c em anéis de aorta torácica de rato.....	40

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>RESUMO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

<b>FIGURA 8</b> - Influência do BQ-123 sobre as contrações induzidas pela endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e carbacol na vesícula biliar isolada de cobaia.	41
<b>FIGURA 9</b> - Influência do RES-701-1 sobre os efeitos contráteis da sarafotoxina S6c e carbacol na vesícula biliar isolada de cobaia .....	43
<b>FIGURA 10</b> - Influência do BQ-788 sobre as contrações induzidas pela endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e carbacol na vesícula biliar isolada de cobaia.....	44
<b>FIGURA 11</b> - Influência do bosentan sobre os efeitos contráteis da endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e carbacol na vesícula biliar isolada de cobaia.....	45
<b>FIGURA 12</b> - Curvas concentração-resposta médias aos efeitos contráteis da big-endotelina-1, big-endotelina-2 e big-endotelina-3 e seus respectivos metabólitos ativos na vesícula biliar isolada de cobaia .....	47
<b>FIGURA 13</b> - Influência do fosforamidom sobre as contrações induzidas pela endotelina-1, big-endotelina-1, endotelina-2 ou big-endotelina-2 na vesícula biliar isolada de cobaia .....	48



## 1- INTRODUÇÃO

A endotelina (ET) é um potente peptídeo vasoconstritor que foi isolado pela primeira vez a partir do sobrenadante da cultura de células endoteliais de aorta de porco (Yanagisawa *et al.*, 1988). Estudos posteriores revelaram que a ET, na verdade, pertence a uma família de peptídeos que induzem múltiplos efeitos em diferentes sistemas fisiológicos (para revisões ver Masaki *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1992; Rae *et al.*, 1995). Em mamíferos existem pelo menos três ETs: ET-1 (a ET descoberta por Yanagisawa *et al.*, 1988), ET-2 e ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). Um quarto isopeptídeo, encontrado no intestino de camundongos e denominado “peptídeo intestinal vasoconstritor” (VIC) ou ET- $\beta$  (Saida *et al.*, 1989), acabou revelando-se como a variante da ET-2 encontrada em camundongos e ratos (Bloch *et al.*, 1991).

Todas as ETs apresentam grande homologia estrutural (60-70%) com as sarafotoxinas S6a, S6b, S6c e S6d, peptídeos isolados do veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (para revisão ver Sokolovsky, 1992). Todos os membros da superfamília das ETs e sarafotoxinas caracterizam-se por possuir 21 resíduos de aminoácidos e duas pontes de dissulfeto unindo pares de resíduos de cisteína (Cis<sup>1</sup>-Cis<sup>15</sup> e Cis<sup>3</sup>-Cis<sup>11</sup>) (Sokolovsky, 1992; Kochva *et al.*, 1993; ver Figura 1).

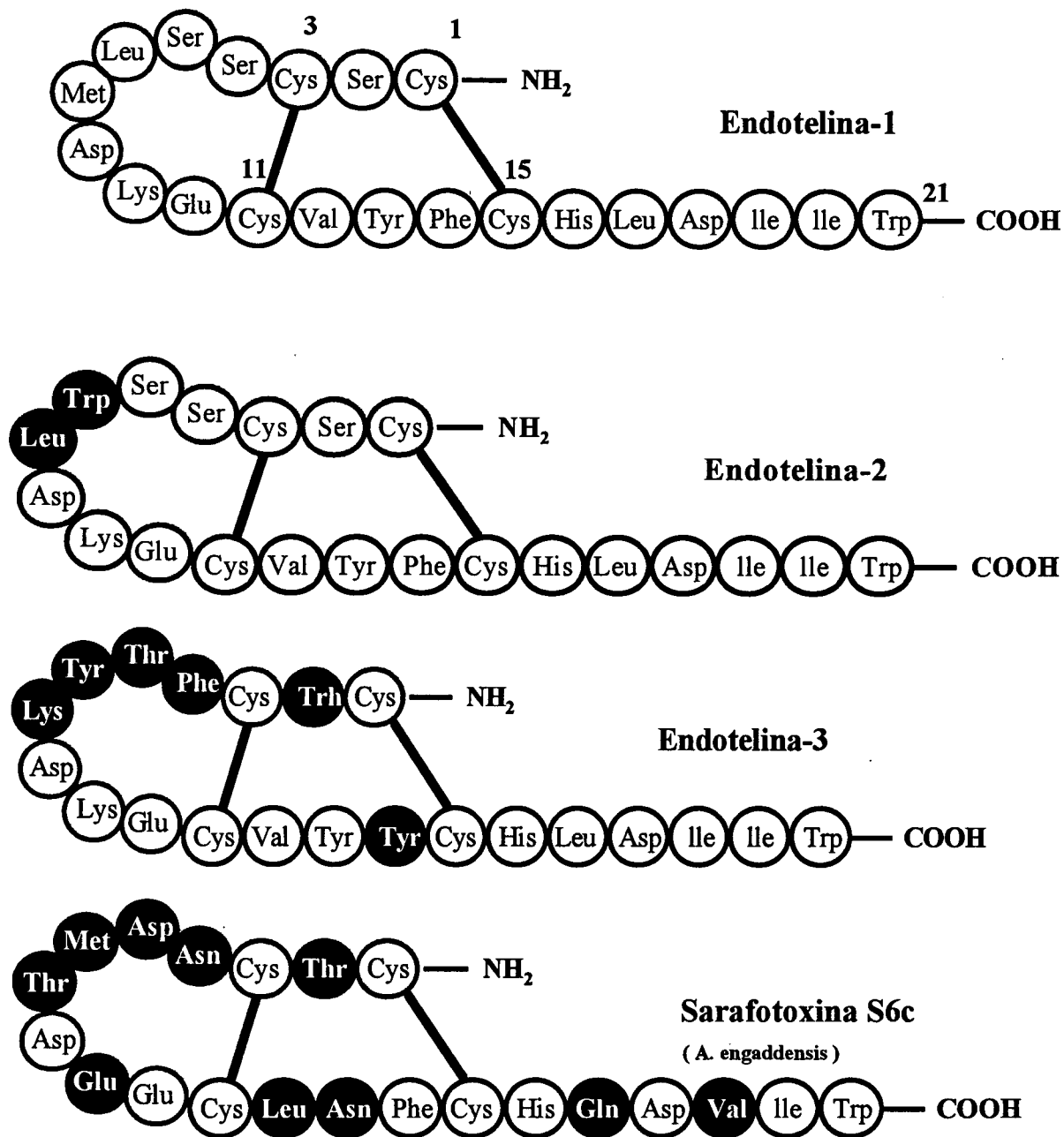
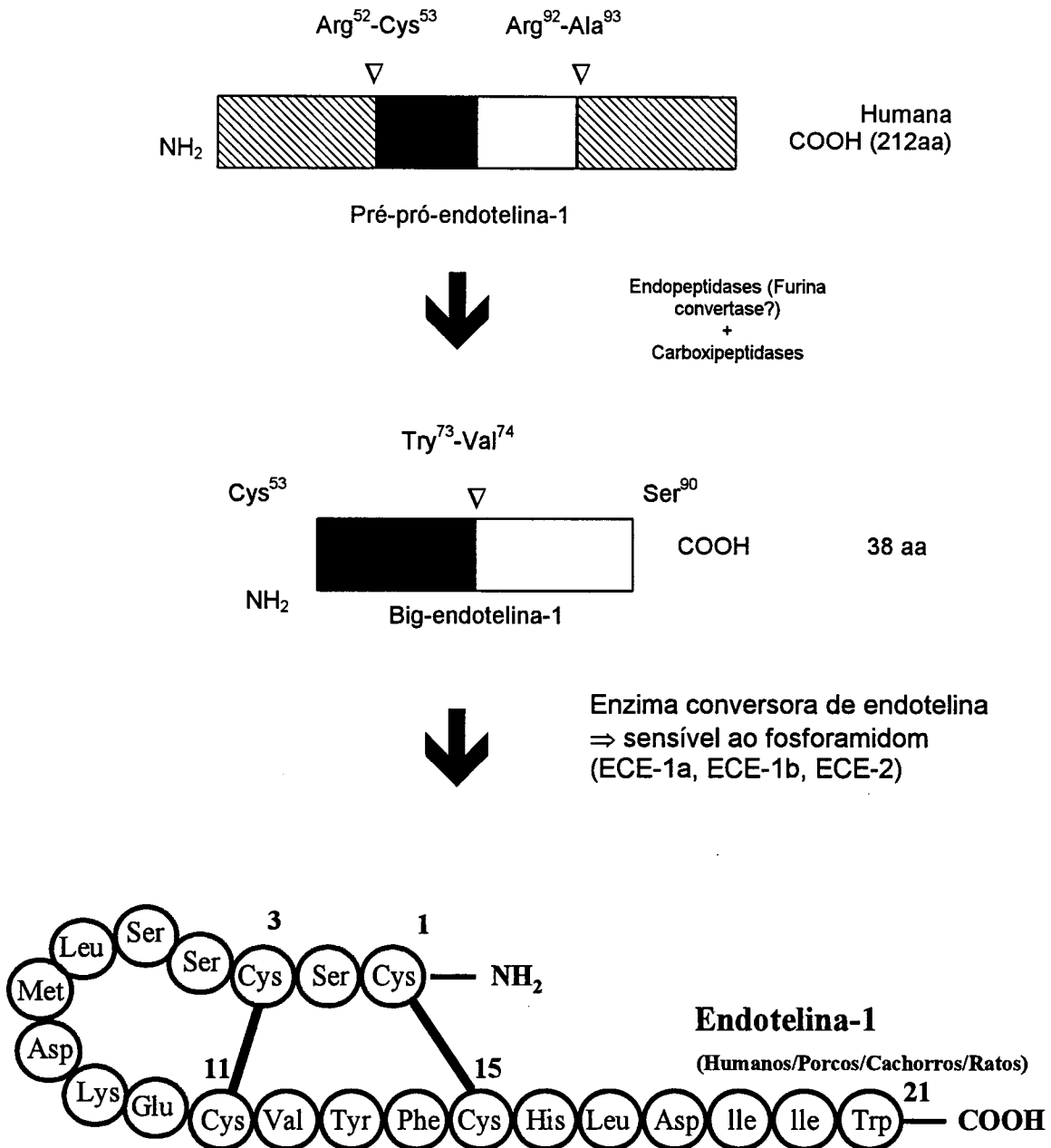


Figura 1 - Estrutura das endotelinas-1, -2, -3 e sarafotoxina S6c.

A síntese de cada ET é codificada por um gene distinto e envolve a clivagem da pré-pró-endotelina específica, por uma endopeptidase ainda não caracterizada, mas que talvez corresponda à furina convertase (Denault *et al.*, 1995), originando um



**Figura 2 - Esquema da biossíntese da endotelina-1.**  
aa = aminoácidos

peptídeo intermediário chamado, genericamente, de big-endotelina (ver Figura 2). Por sua vez, cada big-endotelina é então transformada no peptídeo ativo correspondente por ação de uma enzima conversora de ET (ECE; para revisão ver Battistini *et al.*, 1993).

Até o momento, foram clonadas duas ECEs distintas, denominadas de ECE-1 (Xu *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994) e ECE-2 (Emoto e Yanagisawa, 1995). Ambas são metalopeptidases sensíveis ao bloqueio pelo fosforamidom, mas não pelo tiorfan ou pelo captopril. A ECE-1 apresenta atividade ótima em pH neutro, parece funcionar tanto na via secretória quanto na superfície celular, e possivelmente existe em duas isoformas: a ECE-1a e a ECE-1b. Em contraste, a ECE-2, que é 250 vezes mais sensível ao bloqueio pelo fosforamidom do que a ECE-1, apresenta atividade ótima em pH ácido (5.5) e parece estar localizada na rede trans-Golgi. A ECE-1a e ECE-2 convertem com maior eficácia a big-ET-1 do que a big-ET-2 ou big-ET-3 (Xu *et al.*, 1994; Emoto e Yanagisawa, 1995), enquanto a ECE-1b parece não converter a big-ET-3 (Shimada *et al.*, 1994; Battistini *et al.*, 1995).

Há ainda evidências funcionais e bioquímicas para a ocorrência de outras ECEs (para revisão ver Opgenorth *et al.*, 1995). Chiou *et al.* (1994) isolaram duas ECEs distintas de membranas pulmonares de rato, uma delas insensível ao bloqueio por fosforamidom mas bloqueada por pepstatina A. O canal deferente de

rato parece expressar duas ECEs, uma sensível ao fosforamidom que converte big-ET-1 e big-ET-2 em ET-1 e ET-2, respectivamente, e uma outra enzima que converte a big-ET-3 em ET-3, que é bloqueada pelo tiorfan e/ou na presença de altas concentrações de fosforamidom (Mattera *et al.*, 1993). Além disso, Gratton *et al.* (1995) apresentaram evidências indiretas de que a circulação pulmonar de cobaia *in vivo* converte a big-ET-1, mas não a big-ET-2, enquanto a sistêmica converte ambas. Não foi detectada conversão da big-ET-3 nesse estudo. Em vista dos resultados de Mattera *et al.* (1993), parece então que a conversão da big-ET-3 é realizada por uma ECE diferente das demais.

Os diversos efeitos produzidos pelas ETs são mediados pela ativação de receptores endotelinérgicos específicos. No entanto, apesar da estreita homologia estrutural entre as ETs e as sarafotoxinas, as atividades biológicas das três isoformas apresentam diferenças consideráveis quanto à natureza das respostas que desencadeiam em diversos tecidos, inclusive num mesmo tecido (para revisão ver Kochva *et al.*, 1993). Contudo, um grande número de evidências aponta para a existência de apenas dois receptores endotelinérgicos distintos em mamíferos: o receptor ET<sub>A</sub>, que apresenta maior afinidade pela ET-1 e ET-2 do que pela ET-3, e é bloqueado seletivamente por vários antagonistas, como o BQ-123, o FR 139317 e o BQ-610; e o receptor ET<sub>B</sub>, que não discrimina entre as três ETs endógenas,

sendo ativado seletivamente pela sarafotoxina S6c, IRL-1620 e BQ-3020 e bloqueado seletivamente pelo BQ-788 (para revisão ver Bax e Saxena, 1994).

Há ainda um terceiro receptor, o ET<sub>C</sub>, que apresenta maior afinidade pela ET-3 do que pela ET-1 ou ET-2 e que foi clonado do genoma de anfíbio (Karne *et al.*, 1993). Embora existam evidências funcionais para a ocorrência desse tipo de receptor em mamíferos (Emori *et al.*, 1990), o receptor ET<sub>C</sub> não foi encontrado até agora em genomas de animais dessa classe. Por outro lado, vários estudos funcionais realizados em diferentes tecidos apontam, ainda, para a existência de subtipos de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (Sudjarwo *et al.*, 1993, 1994; Yoneyama *et al.*, 1995), ou receptores endotelinérgicos atípicos (Bax e Saxena, 1994; Maas *et al.*, 1995).

Os receptores endotelinérgicos, que pertencem à superfamília de receptores com 7 domínios transmembrana, podem acoplar-se, através de proteínas G, a múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo as fosfolipases A<sub>2</sub>, C e D, adenilato e guanilato ciclases, à bomba antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Simonson *et al.*, 1989; Ambar e Sokolovsky, 1993) e indiretamente via liberação de outras substâncias bioativas (De Nucci *et al.*, 1988).

O processo vasoconstritor, por exemplo, mediado pelos receptores do tipo ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, envolve a estimulação da fosfolipase C com formação de inositol trifosfato e diacilglicerol a partir do fosfatidilinositol bifosfato. A elevação dos

níveis citosólicos de inositol trifosfato induz a liberação de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dos depósitos intracelulares sarcoplasmáticos (Resink *et al.*, 1988), o que gera um aumento transiente da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, esse aumento é seguido de um acréscimo sustentado da concentração do íon, resultante do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Simonson *et al.*, 1990). Por outro lado, a elevação dos níveis de diacilglicerol ativa a proteína quinase C com conseqüente fosforilação protéica (Sunako *et al.*, 1990). É provável que a formação de fosfatos de inositol pelas ETs estimulem canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptores ou facilitem a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. Tem sido verificado que a ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L nem sempre é necessária para produção de contração da musculatura lisa vascular induzida pela ET-1 (D'Orléans-Juste *et al.*, 1989), sugerindo a participação de outras vias mediando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ativado por esse peptídeo.

As ETs também estimulam a fosfolipase C em outros tipos de células, incluindo fibroblastos 3T3 (Takuwa *et al.*, 1989), miócitos (Vigne *et al.*, 1989) e células mesangiais glomerulares (Simonson *et al.*, 1989). Tem sido sugerido que a formação do diacilglicerol pode ser mediada através da ativação da fosfolipase D, que induz a formação do ácido fosfatídico, a partir da fosfatidilcolina, que será convertido em diacilglicerol (Ambar e Sokolovsky, 1993). A ativação da

fosfolipase D pelas ETs pode ocorrer por via direta ou através da estimulação da proteína quinase C (Billah *et al.*, 1991).

A ET-1 também pode ativar a fosfolipase  $A_2$ , promovendo a formação de ácido araquidônico com conseqüente geração de eicosanóides. A infusão de ET-1 induz a liberação de prostaglandinas e tromboxano  $A_2$  no pulmão perfundido de rato e cobaia (D'Orléans-Juste *et al.*, 1992; De Nucci *et al.*, 1988). No baço e rim de coelho, a inibição da síntese de eicosanóides pela via da cicloxigenase potencializa os efeitos vasoconstritores da ET-1 (Rae *et al.*, 1989). Grassi-Kassisse *et al.* (1994) verificaram que os prostanóides endógenos também modulam a vasoconstrição induzida pela ET-1 no baço perfundido de cão. Possivelmente, a ativação da fosfolipase  $A_2$  é mediada pela estimulação da proteína G em função da ativação do receptor para ET (Reynolds *et al.*, 1989). No entanto, sugere-se ainda que a ativação da fosfolipase  $A_2$  seja uma conseqüência do aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  induzido pela fosfolipase C (Sokolovsky, 1992).

As ETs podem ainda estimular a bomba antiporte  $Na^+/H^+$  que promove alcalinização celular, com conseqüente aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e sensibilização das enzimas dependentes de  $Ca^{2+}$  ao cátion (Vigne *et al.*, 1991). Battistini *et al.* (1991) demonstraram a participação da bomba de  $Na^+/H^+$  na atividade constritora da ET-1 em preparações não vasculares, como anéis de traquéia e brônquio de suíno.



O efeito vasodilatador da ETs pode resultar da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> e conseqüente formação de prostaglandinas (I<sub>2</sub> e/ou E<sub>2</sub>), mencionado anteriormente, bem como na formação de óxido nítrico pelo endotélio vascular (De Nucci *et al.*, 1988), e conseqüente ativação de uma guanilato ciclase solúvel presente em células musculares lisas (Ignarro, 1989).

As ETs podem também modular a atividade da adenilato ciclase ou da guanilato ciclase, sendo que a formação do AMP cíclico pode ser via adenilato ciclase ou indiretamente, via a ativação da fosfolipase C (Sokolovsky, 1992). Yang *et al.* (1991) demonstraram que o efeito vasoconstritor induzido pela ET-1 na artéria caudal isolada de rato é mediado por diminuição na concentração de AMP cíclico citoplasmático. No entanto, a ET-3 em baixas concentrações eleva os níveis citosólicos de GMP cíclico resultando no relaxamento da artéria mesentérica de rato pré-contraída com metoxamina (Fukuda *et al.*, 1991).

Além disso, tem sido demonstrada a participação dos canais de potássio no mecanismo de ação das ETs. Guimarães *et al.* (1992) constataram que a estimulação dos canais de potássio dependentes de ATP por cromacalina, em anéis de veia porta isolada de rato, reduz a atividade vasoconstritora da ET-1, sendo a inibição revertida por glibenclamida, um bloqueador desses canais. A administração de ET-1 em animais de várias espécies causa vasodilatação inicial transiente, que pode ser explicada como decorrente da ativação de receptores do

tipo  $ET_B$ , localizados no endotélio e sensíveis ao bloqueio pelo antagonista não-seletivo de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , PD 142893 (Warner *et al.*, 1993), seguida por vasoconstrição tônica sustentada, devido à ativação de receptores dos tipos  $ET_A$  e  $ET_B$ , localizados na musculatura lisa vascular (Davenport e Maguire, 1994). Como podemos constatar, os mecanismos de ação das ETs são bastante complexos, podendo envolver a ativação de diferentes enzimas e canais iônicos, bem como a liberação de vários mediadores químicos.

As ETs são produzidas por diversos tecidos além do endotélio vascular, e são encontradas no cérebro, coração, rins, epitélio pulmonar e trato urogenital, entre outros (para revisões ver Masaki *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1992). A administração intracerebroventricular de ET-1 em rato ou coelho, em concentrações na ordem de pmol, resulta em convulsões generalizadas e aumento dos níveis plasmáticos de arginina-vasopressina, ocitocina, catecolaminas e glicose, provavelmente devido à estimulação do hipotálamo, glândula pituitária e sistema simpatoadrenal (Matsumura *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1991). Em cultura de células pituitárias, a ET-1 e a ET-3 induzem a secreção dos hormônios luteinizante, folículo-estimulante e tireóide-estimulante e inibem a secreção de prolactina (Kanyicksa *et al.*, 1991). Tem sido sugerida a ocorrência de receptores do subtipo  $ET_{A1}$  e  $ET_{A2}$ , no córtex cerebral e na medula espinhal de rato, respectivamente (Bertelsen *et al.*, 1992), bem como a presença de

receptores do tipo ET<sub>B</sub> na membrana de células cerebelares (Ihara *et al.*, 1990). Assim, tanto as ETs como os seus receptores estão amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central (para revisão ver Gulati e Srimal, 1992), e parecem exercer um controle central importante sobre os sistemas cardiovascular (Gulati e Rebello, 1991) e respiratório (Fuxe *et al.*, 1989), bem como sobre o comportamento (Lecci *et al.*, 1991) e o balanço hídrico e eletrolítico (Samson *et al.*, 1991).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* detectaram que as veias são aproximadamente cem vezes mais sensíveis aos efeitos constritores da ET-1 do que as artérias (Miller *et al.*, 1989). No coração, as ETs induzem efeitos inotrópico e cronotrópico positivos, que provavelmente contribuem para a hipertensão causada pela administração sistêmica de ETs (Hu *et al.*, 1988). Entretanto, o efeito predominante da ET-1 no coração está em causar uma potente vasoconstrição coronariana (Takeshita *et al.*, 1991). Shubeita *et al.* (1990) observaram que miócitos cultivados expostos a ET-1 apresentaram alterações moleculares e celulares características da hipertrofia cardíaca. A injeção intravenosa de ET-1 aumenta os níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (Goetz *et al.*, 1988), um potente agente natriurético e diurético, e estimula a sua secreção nas preparações de átrio isolado de rato (Hu *et al.*, 1988) e em cultura de miócitos atriais (Fukada *et al.*, 1988). Em contrapartida, a ET-1 também estimula a síntese de aldosterona, conhecida por sua propriedade antinatriurética, em células isoladas

da zona glomerulosa (Cozza *et al.*, 1989) e aumenta a sua liberação *in vivo*. A ET-1 pode ainda alterar a função renal através da redução da taxa de filtração glomerular, que é observada tanto na infusão direta intra-renal de ET-1 *in vivo* (Kato *et al.*, 1990), como nos casos de rim isolado e perfundido (Cairns *et al.*, 1989). Nesse sentido, os efeitos complexos da ETs sobre as funções renais parecem decorrer da combinação de ações intra- e extra-renais (para revisão ver Simonson, 1993).

No trato respiratório humano e de cobaia, a ET-1 induz vasoconstrição e contração do músculo liso brônquico e da traquéia (Hay *et al.*, 1993). A broncoconstrição causada pela ET-1 em cobaia parece depender da ativação de receptores do tipo ET<sub>B</sub> (Hay *et al.*, 1993) e da liberação de tromboxano A<sub>2</sub> (Payne e Whittle, 1988). É importante ressaltar que o epitélio pulmonar é um dos principais locais de síntese de ET-1. Vários estudos demonstram que células epiteliais pulmonares cultivadas de camundongo, rato (Rozengurt *et al.*, 1990), coelho (Rennick *et al.*, 1992), cobaia (Ninomiya *et al.*, 1991), cão, porco (Black *et al.*, 1989) e humana (Mattoli *et al.*, 1990) secretam ET-1.

A ET-1 também atua no trato urogenital induzindo contração tônica do músculo detrusor da bexiga humana (Maggi *et al.*, 1990), de rato (Donoso *et al.*, 1994), coelho (Garcia-Pascual *et al.*, 1993) e porco (Persson *et al.*, 1992). Experimentos *in vitro* demonstraram que a ET-1 é um potente agente contrátil do

músculo liso prostático (Langenströer *et al.*, 1993) e do corpo cavernoso humano (Holmquist *et al.*, 1990). Concentrações elevadas de ET-1 são encontradas nos testículos de rato (Matsumoto *et al.*, 1989) e no fluido seminal humano (Casey *et al.*, 1992). Tem sido demonstrada a presença de receptores do tipo ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, respectivamente, no estroma e no epitélio glandular prostático humano (Kobayashi *et al.*, 1994). No trato genital feminino, a ET-1 aumenta o tônus e a frequência das contrações espontâneas do útero de rata (Calixto e Rae, 1991), provavelmente por ativação de receptores ET<sub>A</sub> (Rae *et al.*, 1993). Resultados semelhantes foram obtidos no útero humano não-grávido (Word *et al.*, 1990). Iwai *et al.* (1993) detectaram a presença de RNAm para receptores ET<sub>A</sub> na camada muscular lisa da trompa de Falópio de rata. Como podemos constatar, as ETs estão amplamente distribuídas por todo o organismo, no entanto, resta elucidar se os efeitos observados correlacionam-se ou não com uma função fisiológica e/ou fisiopatológica.

Além disso, as ETs também são encontradas em diversas células do trato gastrointestinal. Em ratos, a ET-1 e/ou seu RNAm estão presentes em quantidades significativas no estômago, intestino delgado, cólon, baço e fígado (Takahashi *et al.*, 1990). Níveis apreciáveis de ET-3 também ocorrem no intestino delgado dessa espécie, mas outros tecidos/órgãos do trato apresentam quantidades bem menores do peptídeo (Matsumoto *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990). O intestino delgado

de camundongo expressa tanto ET-1 quanto ET- $\beta$  (Saida *et al.*, 1989). Na espécie humana, quantidades significativas de ET-1 são produzidas no cólon e pelo epitélio biliar (Inagaki *et al.*, 1991a; Housset *et al.*, 1993), mas ainda não se sabe se essa e as demais ETs estão presentes em outras partes do trato. No estômago de rato e humano, boa parte da ET-1 e da ET-3 aparecem concentradas nas células principais e algumas parietais do corpo gástrico, bem como em células enterocromafins do fundo gástrico (Saeki *et al.*, 1993). Tanto a ET-1 quanto a ET-3 também parecem estar presentes em plexos nervosos e na musculatura lisa adjacente (Saeki *et al.*, 1993), mas Takahashi *et al.* (1990) relataram que a maior parte da ET-1 presente no cólon e intestino delgado de rato está associada à camada mucosa. No cólon humano, a ET-1 apresenta-se concentrada principalmente nos plexos nervosos mioentéricos e submucosos (Inagaki *et al.*, 1991b).

Experimentos conduzidos com diversos tecidos isolados do trato gastrintestinal têm demonstrado que as ETs produzem efeitos complexos na motilidade (para revisão ver Rae *et al.*, 1995). Nesse sentido, a ET-1 causa contrações da porção *muscularis* da mucosa do esôfago (Eglen *et al.*, 1989), fundo de estômago (De Nucci *et al.*, 1988; Warner *et al.*, 1993; Fulginitti *et al.*, 1993), cólon de rato (Lembeck *et al.*, 1989; Moumami *et al.*, 1992a) e da vesícula biliar de cobaia (Moumami *et al.*, 1992b; Battistini *et al.*, 1994). Por outro lado, o peptídeo

inicialmente relaxa e depois contrai o jejuno de coelho (Lembeck *et al.*, 1989) e o íleo de cobaia (Guimarães e Rae, 1992), mas apenas relaxa a *taenia coli* de cobaia além de inibir a atividade espontânea dessa preparação (Wiklund *et al.*, 1989; Usune *et al.*, 1991). Os mecanismos e os receptores endotelinérgicos envolvidos nessas ações são conhecidos parcialmente em algumas dessas preparações, como no fundo de estômago de rato, e no íleo e vesícula biliar de cobaia, mas em outras ainda não foram definidos. Além de afetarem a motilidade de tecidos/órgãos gastrintestinais *in vitro*, as ETs também aumentam a secreção de íons cloreto em mucosa isolada do íleo ou cólon de rato e coelho (Moumami *et al.*, 1992a; Brown e Smith, 1991; Roden *et al.*, 1992). Tal efeito parece envolver a ativação de receptores ET<sub>B</sub> no coelho e ET<sub>A</sub> no rato, geração de prostanóides, co-secreção de potássio e estimulação do plexo submucoso (pelo menos no rato).

Embora até o presente não se saiba quais são os papéis fisiológicos das ETs no trato gastrintestinal adulto, esses peptídeos parecem ser importantes no desenvolvimento embriológico normal do trato. Estudos recentes demonstraram, em camundongos, que a deleção (*knockout*) do gene codificando a ET-3 ou o receptor endotelinérgico ET<sub>B</sub> do óvulo da origem a filhotes que morrem de megacólon em poucas semanas (Baynash *et al.*, 1994; Hosoda *et al.*, 1994). A análise histológica desses animais revelou que o cólon distal apresentava-se aganglionar. Portanto, tanto a ET-3 quanto os receptores ET<sub>B</sub> parecem ser

importantes, durante a embriogênese, na migração de neurônios do neurotubo para o trato gastrointestinal distal. Infelizmente, não há informações semelhantes a respeito da relevância das demais ETs ou do receptor ET<sub>A</sub> no desenvolvimento embrionário do trato gastrointestinal, pois filhotes desenvolvidos de embriões sem o gene para a ET-1 ou o receptor ET<sub>A</sub> são inviáveis, por apresentarem graves deformações do crânio e porção cervical (Kurihara *et al.*, 1994).

Por outro lado, há evidências de que as ETs possam estar implicadas em algumas fisiopatologias, como a úlcera gástrica, a colite ulcerativa e a doença de Crohn. As ETs são potentes agentes ulcerogênicos em ratos, quando injetados por via intravenosa (local ou sistêmica) ou diretamente na camada submucosa (Wallace *et al.*, 1989; Lazaratos *et al.*, 1993), e potencializam a ação de outros agentes pró-ulcerogênicos como a indometacina (inibidor de cicloxigenase) e o etanol (Wallace *et al.*, 1989; Peskar *et al.*, 1992; Masuda *et al.*, 1993). O etanol aumenta a produção de ET-1 pela mucosa gástrica (Masuda *et al.*, 1993), e a administração de anticorpos anti-ET-1 reduz a incidência de úlceras gástricas induzidas por etanol ou indometacina (Masuda *et al.*, 1993; Kitajima *et al.*, 1993). Embora muitos autores postulem que a ação ulcerogênica da ET-1 decorra de seus efeitos vasoconstritores diretos no leito gástrico, há indicações de que a lesão da mucosa gástrica envolva também outros mecanismos, incluindo a produção do fator de ativação plaquetária e tromboxano A<sub>2</sub> (Filep *et al.*, 1991a). O fator de



ativação plaquetária também parece mediar parte da necrose intestinal induzida por ET-1 em ratos (Miura *et al.*, 1991). Quanto ao envolvimento das ETs na colite ulcerativa e doença de Crohn, há um estudo demonstrando níveis elevados de ET-1 em amostras intestinais coletadas de pacientes com essas patologias (Murch *et al.*, 1992). Finalmente, como as ETs afetam mecanismos secretórios intestinais, é possível que elas participem na gênese de quadros diarréicos, embora ainda não existam evidências objetivas nesse sentido. Convém mencionar que poucos trabalhos até agora têm investigado as ações das ETs sobre o trato gastrointestinal *in vivo*. Até o presente momento, tais estudos tem sido basicamente restritos ao papel das ETs no desenvolvimento de úlceras gástricas.

Outro componente do trato gastrointestinal que não foi mencionado até aqui é o trato biliar, constituído pelo canalículos biliares hepáticos, a vesícula biliar, ducto colédoco e esfíncter de Oddi. Moumami *et al.* (1992b) verificaram que a ET-1 é quase tão potente quanto a colecistocinina (26-33) (CCK-8) em causar contração de tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Além disso, evidenciaram que esse efeito não é modificado pela indometacina, atropina ou tetrodotoxina, porém foi parcialmente inibido pela nicardipina, diltiazem e remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  ou estrôncio da solução nutriente. Esses resultados permitiram sugerir que o efeito contrátil da ET-1 nessa preparação depende do influxo  $\text{Ca}^{2+}$  de através de canais do tipo L e da sua mobilização de depósitos intracelulares sensíveis ao estrôncio. Células epiteliais

cultivadas da vesícula biliar e do trato biliar intra- e extra-hepático humanos expressam RNAm para ET-1 e secretam esse peptídeo (Housset *et al.*, 1993). A ET-1 também aumenta a frequência de contração dos canalículos biliares que se formam entre hepatócitos cultivados de rato (Kamimura *et al.*, 1993). Embora ainda não existam estudos demonstrando a influência da ET-1 no esfíncter de Oddi, não podemos descartar essa possibilidade, baseado no fato de que praticamente todo o trato biliar e o trato gastrintestinal respondem a esse peptídeo.

## **2 - OBJETIVOS**

O presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

1. Caracterizar os efeitos contráteis da ET-1 na vesícula biliar isolada de cobaia, comparando-os aos da CCK-8, histamina e carbacol.
2. Avaliar a participação de alguns mecanismos celulares na mediação das contrações induzidas pela ET-1 nessa preparação.
3. Identificar, através de estudos funcionais com agonistas e antagonistas, os receptores endotelinérgicos que medeiam os efeitos das ETs na vesícula de cobaia.
4. Verificar se essa preparação apresenta atividade conversora para ETs.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Animais

Os experimentos foram realizados com cobaias de ambos os sexos, pesando entre 300 a 450 g, e com ratos machos Wistar, pesando entre 200 a 300 g, criados no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (6 a 10 por gaiola) em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes ligadas às 6 h). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

#### 3.2- Montagem das preparações

##### 3.2.1. Vesícula biliar isolada de cobaia

As cobaias foram anestesiadas levemente com éter, e em seguida sacrificadas com um golpe na cabeça e deslocamento cervical. Após a laparotomia, a vesícula biliar foi retirada, com o cuidado de esgotar a bile, e colocada numa placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (ver composição a seguir) morna para remoção de tecidos aderentes e divisão em 4 tiras longitudinais semelhantes (10 mm por 3 mm;  $7,6 \pm 0,3$  mg, n = 150). Embora a maioria das tiras tenha sido montada com a mucosa íntegra, em alguns experimentos a mucosa foi deliberadamente retirada por fricção cuidadosa da face

luminal da preparação com um cotonete de algodão umedecido com solução fisiológica. A retirada da mucosa foi comprovada por análise histológica. Cada tira foi então transferida para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit (composição mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; NaHCO<sub>3</sub> 25 e glicose 11- pH 7.2-7.4) aquecida a 37°C e borbulhada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, conectada a um transdutor isométrico e submetida a uma tensão inicial de 0,5 g. As contrações isométricas foram registradas por miógrafos (F-60 myograph microdisplacement transducer, Narco Biosystems, USA) acoplados a um polígrafo de mesa (DMP-4B, Narco Biosystems, USA).

Após um período de estabilização de no mínimo 1 h, durante o qual a solução nutriente foi renovada a cada 15 min, todas as preparações foram expostas à solução de Krebs-Henseleit contendo 80 mM de KCl (por substituição equimolar de NaCl por KCl; **KCl 80 mM**) como estímulo padrão. Uma vez estabilizada a resposta contrátil ao KCl 80 mM, o que geralmente ocorria dentro de aproximadamente 15 min, cada preparação foi lavada diversas vezes com solução normal de Krebs-Henseleit e equilibrada por mais 30 a 45 min antes de qualquer nova intervenção experimental. Todas as respostas contráteis subsequentes da preparação foram calculadas considerando a resposta obtida ao KCl 80 mM como 100%.

### 3.2.2. Anel de aorta torácica isolada de rato

Ratos foram anestesiados levemente com éter e em seguida sacrificados com um golpe na cabeça, deslocamento cervical e exsanguinação. A cavidade torácica foi aberta para a retirada da aorta torácica, que foi colocada numa placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (mesma composição citada anteriormente, exceto pela adição de EGTA 0,02 mM e ácido ascórbico 0,01 mM) morna para remoção cuidadosa dos excessos de tecido adiposo adjacente e divisão em 4 anéis semelhantes de cerca de 3-4 mm de comprimento. A maioria dos anéis foi utilizada sem remoção deliberada do endotélio. Porém, em algumas preparações o endotélio foi removido pela introdução de uma haste de platina na luz do anel e rolagem repetida da preparação sobre papel de filtro umedecido com solução nutriente. Em seguida cada preparação, com ou sem endotélio, foi transferida para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, nas mesmas condições descritas anteriormente, suspensas entre duas hastes metálicas, uma das quais conectada a um transdutor isométrico, e distendida a uma tensão basal de 1,0 g. Após um período de estabilização de pelo menos 1 h, com renovações da solução nutriente a cada 15 min, cada preparação foi contraída com fenilefrina (100 nM) e exposta, na presença do vasoconstritor, à acetilcolina (1  $\mu$ M). O endotélio foi considerado preservado ou íntegro apenas nos anéis que apresentaram pelo menos 80% de relaxamento em resposta à acetilcolina (Karaki

*et al.*, 1994). Por outro lado, apenas anéis em que houve total ausência de relaxamento em resposta à acetilcolina foram considerados sem endotélio. Uma vez feita a avaliação da integridade do endotélio, cada preparação foi lavada repetidas vezes com solução nutriente, e aguardou-se pelo menos mais 30 min antes de qualquer nova manipulação experimental.

### **3.3- Procedimentos experimentais**

#### **3.3.1. Vesícula biliar de cobaia**

##### *3.3.1.1. Comparação dos efeitos contráteis da endotelina-1 e de outros agonistas*

Decorrido o tempo de estabilização necessário para o retorno da tensão ao nível basal, diferentes preparações obtidas de um mesmo animal foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de ET-1 (0,01 a 100 nM), colecistocinina sulfatada (26-33) (CCK-8) (0,01 a 100 nM), carbacol (3 nM a 300  $\mu$ M) ou histamina (3 nM a 300  $\mu$ M). Cada concentração de agonista foi adicionada à cuba apenas após a estabilização do efeito da concentração precedente. Apenas uma curva concentração-efeito cumulativa foi obtida em cada preparação.

##### *3.3.1.2. Mecanismos celulares de ação da endotelina-1*

Foram realizadas duas séries de experimentos para elucidar a importância do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular nos efeitos contráteis da ET-1 na vesícula biliar isolada de cobaia. Na primeira série, avaliamos a participação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-

operados do tipo L na mediação de contrações induzidas por ET-1. Curvas concentração-resposta cumulativas para ET-1 foram obtidas na ausência ou na presença de nicardipina (0,1; 1 ou 10  $\mu\text{M}$ ), incubada 30 min antes do início da curva ao agonista. Na segunda série de experimentos, algumas preparações foram lavadas com solução nutriente sem  $\text{Ca}^{2+}$  durante 30 min (contendo 1 mM de EGTA durante os primeiros 20 min, para remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  ligado à membrana) antes da obtenção de uma curva cumulativa à ET-1 (0,1 a 30 nM) em solução sem  $\text{Ca}^{2+}$  e sem EGTA. Uma vez estabilizado o efeito da concentração maior do agonista, adicionou-se 2,5 mM de cálcio à cuba e registrou-se sua influência sobre a contração induzida pela ET-1 por mais 10 min.

Também foram realizados experimentos para avaliar a influência dos produtos da via da cicloxigenase (prostanóides) na resposta contrátil da vesícula biliar à ET-1. Nesses, os bloqueadores da ciclooxigenase indometacina (5,6  $\mu\text{M}$ ) ou ibuprofeno (5  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados à cuba pelo menos 30 min antes da obtenção de uma curva à ET-1.

### *3.3.1.3. Caracterização dos receptores endotelinérgicos*

Com o objetivo de identificar os receptores envolvidos no efeito contrátil induzido pela ET-1 na vesícula biliar isolada de cobaia, comparou-se o perfil de ação de diferentes agonistas para receptores endotelinérgicos. Nesses experimentos, foram obtidas curvas concentração-efeito cumulativas aos efeitos



contráteis da ET-1, ET-2 ou ET-3, ou dos agonistas seletivos de receptores ET<sub>B</sub> sarafotoxina S6c ou IRL 1620 (todos 0,01 a 100 nM).

Como abordagem alternativa à caracterização farmacológica dos receptores endotelinérgicos na vesícula biliar, também foram avaliadas as influências de antagonistas desses receptores nos efeitos contráteis da ET-1, ET-3 e/ou sarafotoxina S6c (todos 0,1 a 100 nM). Nesses experimentos, testou-se a influência da incubação com o BQ-123 (300 nM), um antagonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>A</sub>; o RES-701-1 (3 µM) e o BQ-788 (300 nM e 1 µM), ambos antagonistas seletivos de receptores do tipo ET<sub>B</sub>; e o bosentan (1 µM), um antagonista não-seletivo de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Cada antagonista foi adicionado à cuba 20 min antes de iniciar a curva concentração-efeito ao agonista na presença do antagonista. Convém esclarecer, ainda, que cada preparação foi exposta a uma única concentração de antagonista ou veículo (igual volume de tampão fosfato ou água bidestilada) e submetida a uma única curva concentração-efeito a um agonista. A especificidade de ação dos antagonistas de receptores endotelinérgicos foi verificada testando-se suas influências sobre a resposta contrátil da vesícula biliar ao carbacol.

#### *3.3.1.4. Presença de atividade conversora de endotelina*

Outra série de experimentos foi conduzida com o propósito de investigar a ocorrência de enzima conversora de ETs (ECE) na vesícula biliar de cobaia.

Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à ET-1, ET-2 ou ET-3 (0,1 a 100 nM), ou aos seus respectivos precursores imediatos big-ET-1, big-ET-2 ou big-ET-3 (1 a 100 nM), na ausência (somente veículo, i.e. tampão fosfato) ou na presença do inibidor de metaloproteases, fosforamidom (100  $\mu$ M), incubado 45 min antes do início da curva ao agonista.

### 3.3.2. Anel de aorta torácica de rato

Para confirmar a atividade das amostras dos diversos antagonistas endotelinérgicos utilizados nos experimentos com vesícula biliar de cobaia, os mesmos foram testados em anéis de aorta torácica de rato. Trinta min após a confirmação da integridade ou remoção do endotélio, as preparações foram expostas a BQ-123 (300 nM), RES-701-1 (3  $\mu$ M), BQ-788 (1  $\mu$ M) ou bosentan (1  $\mu$ M), ou igual volume de veículo. Em preparações sem endotélio, e após 20 min de incubação, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas ao efeito vasoconstritor da endotelina-1 (0,1 a 100 nM), na presença de BQ-123 ou bosentan. Por outro lado, preparações com endotélio íntegro foram pré-contraídas com fenilefrina (100 nM) 20 min após incubação com RES-701-1, BQ-788 ou bosentan. Uma vez estabilizada a contração, foram expostas, na presença do antagonista, a concentrações crescentes e cumulativas de sarafotoxina S6c (0,01 a 100 nM).

### 3.4- Apresentação dos resultados e análise estatística

As contrações induzidas pelos agonistas na vesícula biliar isolada de cobaia são apresentadas como porcentagens da resposta ao estímulo padrão KCl 80 mM (tomada como 100%). Por outro lado, as contrações induzidas por ET-1 ou fenilefrina ou os relaxamentos causados pela sarafotoxina S6c em anéis de aorta torácica de rato são apresentados como tensão absoluta (em g) ou porcentagens de relaxamento em relação à contração inicial, respectivamente. Os resultados de todos os experimentos são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os efeitos máximos dos diversos agonistas estão simbolizados por  $E_{m\acute{a}x}$ . As concentrações efetivas 50% ( $CE_{50}$ ; i.é., as concentrações de agonistas necessárias para causar a metade do  $E_{m\acute{a}x}$  do próprio agonista, em experimentos individuais) são apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança para 95% (Fleming *et al.*, 1972).

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas (Snedecor e Cochran, 1967). Diferenças ponto-a-ponto entre os valores experimentais obtidos em grupos distintos com níveis de probabilidade iguais ou menores do que 5% ( $P \leq 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes.

### 3.5- Drogas, sais e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada e com sais de pureza analítica (Merck A. G., Rio de Janeiro - Brasil ou Darmstadt - Alemanha).

A ET-1, ET-2, ET-3, sarafotoxina S6c, big-ET-1 (1-38), big-ET-2 (1-37), big-ET-3 (1-39) (todas humanas) e o fosforamidom foram adquiridas da Peninsula Laboratories (Belmont, EUA) ou da American Peptide Company (Sunnyvale, EUA). O fragmento 26-33 amida sulfatado [Tyr(SO<sub>3</sub>H)<sup>27</sup>]-colecistocinina (CCK-8), cloridrato de carbacol, difosfato de histamina, nicardipina, ibuprofeno, fenilefrina e acetilcolina foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). O IRL 1620 [Suc-(Glu<sup>9</sup>, Ala<sup>11,15</sup>)-ET-1] foi generosamente cedido pela Ciba-Geigy (Tarazuka, Japão). O BQ-123 [ciclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu)] foi adquirido da Bachem (Torrance, EUA). O BQ-788 (N-cis-2,6-dimetil-piperidinocarbonil-L-gama-metileucil-D-1-metóxi-carboniltriptofanil-D-norleucina) foi gentilmente cedido pela Banyu Pharmaceutical Company (Tsukuba, Japão). O bosentan {4-tetra-butil-N-[6-(2-hidróxi-etóxi)-5-(2-metóxi-fenóxi)-2,2'-bipirimidina-4-il]-benzenosulfonamida} foi gentilmente cedido pela F. Hoffmann-La Roche A.G. (Basel, Suíça). O RES-701-1 [(Gly<sup>1</sup>-Asp<sup>9</sup>)(Gly-Asn-Trp-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Asp-Trp-Phe-Phe-Asn-Tyr-Tyr-Trp) cíclico] foi doado pelo Tokyo Research Laboratories (Tóquio, Japão).

A maioria das soluções estoque foi preparada com tampão fosfato. A nicardipina foi dissolvida em etanol P.A. absoluto e o IRL 1620 em hidróxido de sódio 0,01 N. O bosentan foi preparado em água bidestilada aquecida em banho-maria (50-60°C) até sua completa dissolução, e, para evitar a recristalização, a solução foi mantida a temperatura ambiente e utilizada num prazo máximo de 24 h. O RES-701-1 foi dissolvido em dimetilsulfóxido (solução estoque), sendo as demais diluições feita em água bidestilada.

A maior parte das drogas foi armazenada na forma de soluções estoque (10  $\mu\text{M}$  a 1 mM), mantidas em tubos siliconizados à -18°C, e diluídas até a concentração desejada imediatamente antes de serem utilizadas. Para minimizar a fotodegradação das diidropiridinas, as soluções estoque de nicardipina foram mantidas em frascos embrulhados em folha de alumínio. Ainda, nos experimentos em que se fez uso dessa droga, as cubas de vidro foram protegidas da luz com folhas de alumínio e a iluminação do laboratório foi mantida em níveis mínimos.

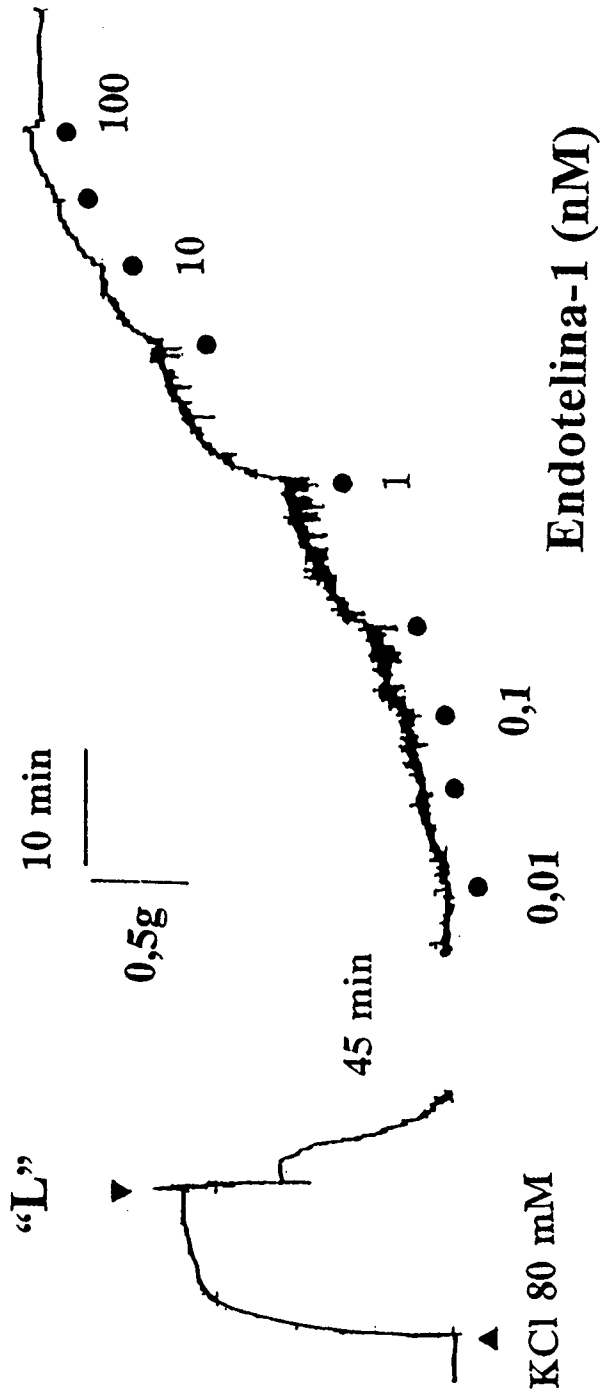
## 4 - RESULTADOS

### 4.1- Comparação dos efeitos contráteis da endotelina-1 e de outros agonistas

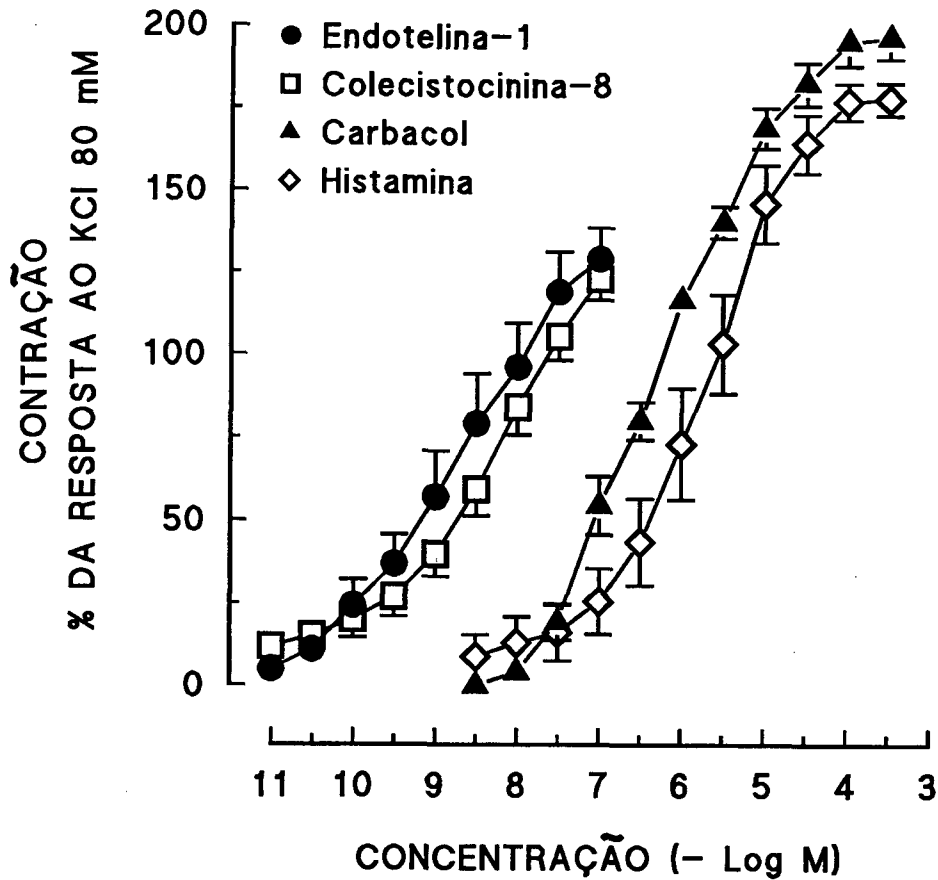
Tiras de vesícula biliar isoladas de cobaias expostas à solução de KCl (80 mM) responderam com contração sustentada média de  $2.08 \pm 0.09$  g de tensão por 10 mg de tecido úmido ( $n = 150$ ), que se estabilizou dentro de aproximadamente 15 min.

A adição de concentrações cumulativas crescentes de ET-1 (0,01-100 nM) causou uma contração tônica gradativa da preparação (Figura 3). Os outros agonistas testados, CCK-8, histamina e carbacol, também causaram contrações sustentadas das preparações, que se desenvolveram mais rapidamente que aquelas induzidas pela ET-1 (resultados não apresentados). Além disso, as contrações máximas induzidas pela ET-1 mostraram-se resistentes as lavagens sucessivas das preparações. As respostas correspondentes causadas pelos demais agonistas foram prontamente revertidas após a lavagem. A Figura 4 ilustra e a Tabela 1 apresenta os resultados médios desses experimentos. A ET-1 apresentou potência e efeito máximo semelhantes aos da CCK-8, e embora ambos fossem mais potentes que o carbacol ou a histamina, esses últimos apresentaram  $E_{m\acute{a}x}$ s significativamente maiores.

# PESO DO TECIDO 7,4 mg



**FIGURA 3** - Registro isométrico típico dos efeitos contráteis induzidos pela exposição de tiras de vesícula biliar isolada de cobaia a concentrações crescentes e cumulativas de endotelina-1. "L" indica 3 lavagens sucessivas da preparação com solução de Krebs-Henseleit normal. O traçado, obtido em uma tira pesando 7,4 mg, é representativo da média de mais de 30 experimentos.



**FIGURA 4** - Curvas concentração-resposta média aos efeitos contráteis da endotelina-1, colecistocinina sulfatada (26-33) (CCK-8), carbacol e histamina na vesícula biliar isolada de cobaia. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos.



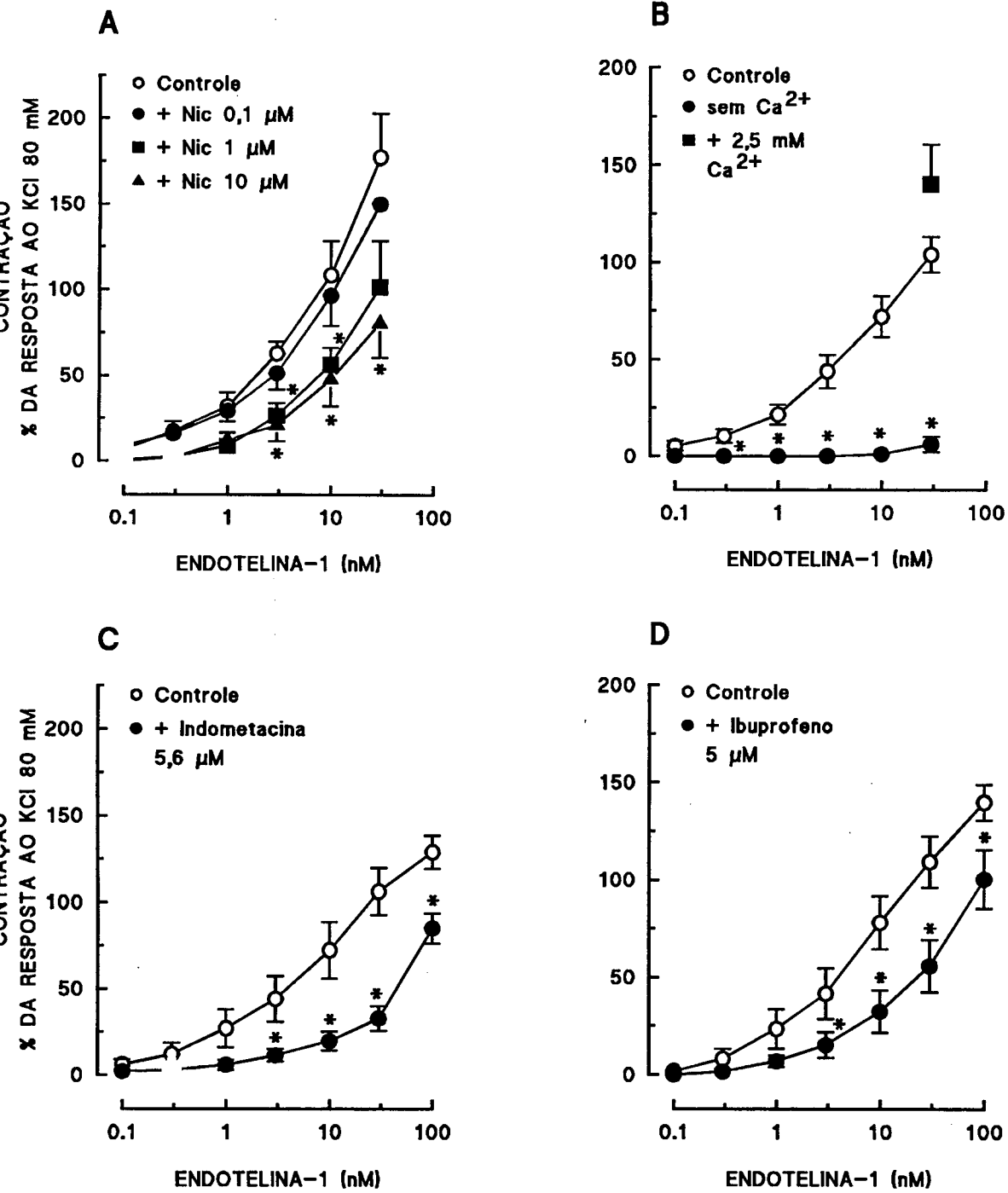
**TABELA 1** - Efeitos contráteis de diferentes agonistas em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. As  $CE_{50}$ s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. Os  $E_{máx}$ s estão expressos como a média  $\pm$  E. P. M., como percentagens da resposta de cada preparação ao KCl 80 mM. O valor de “n” indica o número de experimentos. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao valor correspondente à ET-1 (teste “t” de Student, não pareado).

AGONISTA	$CE_{50}$ nM	$E_{máx}$ (%)	n
Endotelina-1	1,7 (0,6-5,3)	129 $\pm$ 10	6
CCK-8	4,7 (1,5-7,5)	123 $\pm$ 7	6
Carbacol	492 (318-764)*	197 $\pm$ 7*	6
Histamina	1685 (568-4991)*	178 $\pm$ 5*	6

#### 4.2- Mecanismos de ação contrátil da endotelina-1

A incubação da preparação com nicardipina (0,1 a 10  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, provocou inibição dependente de concentração da reatividade à ET-1 (Figura 5A). No entanto, mesmo na presença da concentração mais elevada de nicardipina (10  $\mu\text{M}$ ), as preparações ainda apresentaram respostas significativas à ET-1. Por outro lado, a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  da solução nutriente praticamente aboliu a resposta contrátil induzida pela ET-1 (Figura 5B). Além disso, a reintrodução do cátion ao meio, na concentração de 2,5 mM e ainda em presença de ET-1 (30 nM), provocou uma resposta contrátil semelhante àquela induzida pela adição do peptídeo em solução nutriente normal (Figura 5B).

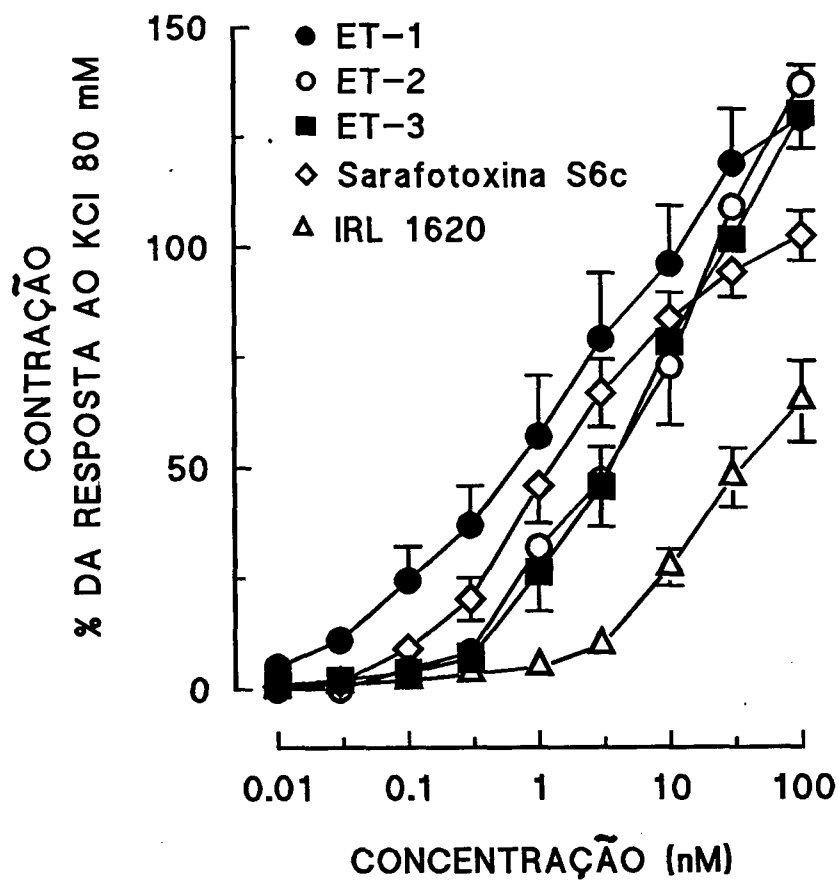
A incubação do tecido com os inibidores da cicloxigenase indometacina (5,6  $\mu\text{M}$ ) ou ibuprofeno (5  $\mu\text{M}$ ) resultou em redução significativa da resposta da vesícula biliar à ET-1 (figuras 5C e 5D). No entanto, a indometacina não alterou as respostas contráteis induzidas pelo carbacol ( $\geq 300$  nM; n = 6; resultados não apresentados).



**FIGURA 5** - Influências da nicardipina (A), remoção de cálcio da solução fisiológica (B), ou da presença de indometacina (C) ou ibuprofeno (D) na reatividade de tiras de vesícula biliar isolada de cobra à ET-1. A nicardipina (em A), a indometacina (em C) e o ibuprofeno (em D) foram adicionadas ao banho 30 min antes da exposição à ET-1. Em "B" a preparação foi equilibrada em solução fisiológica sem cálcio por 30 min (contendo também 1 mM de EGTA durante os primeiros 20 min) antes de iniciar a curva à ET-1. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste "t" bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média ± E. P. M. de 5 a 6 experimentos e asteriscos denotam  $P \leq 0,05$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle.

### 4.3- Comparação dos efeitos de agonistas de receptores endotelinérgicos

A Figura 6 ilustra as curvas concentração-efeito médias aos efeitos das endotelinas naturais de mamíferos ET-1, ET-2 e ET-3, bem como dos agonistas seletivos de receptores ET<sub>B</sub>, a sarafotoxina S6c e o IRL 1620, na vesícula biliar de cobaia. Os perfis de ação da ET-2 e da ET-3 foram semelhantes àquele apresentado pela ET-1 (Tabela 2). Apesar das CE<sub>50</sub>s da ET-2 e ET-3 terem sido 3.7 vezes maiores do que a da ET-1, essa diferença não foi significativa (Tabela 2). Por outro lado, embora a potência do agonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>B</sub>, sarafotoxina S6c, tenha sido também semelhante à da ET-1, o E<sub>máx</sub> desse agonista foi significativamente menor que o da ET-1, cerca de 30% (Figura 6, Tabela 2). Embora a vesícula biliar de cobaia também tenha respondido ao IRL 1620, essa droga foi menos ativa do que os demais agonistas endotelinérgicos testados. Não foi possível determinar a CE<sub>50</sub> do IRL 1620, pois a resposta máxima não foi alcançada até a concentração de 100 nM (Figura 6, Tabela 2).



**FIGURA 6** - Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3, sarafotoxina S6c e IRL 1620 na vesícula biliar isolada de cobraia. Cada valor representa a média  $\pm$  E. P. M. de 4 a 7 experimentos.

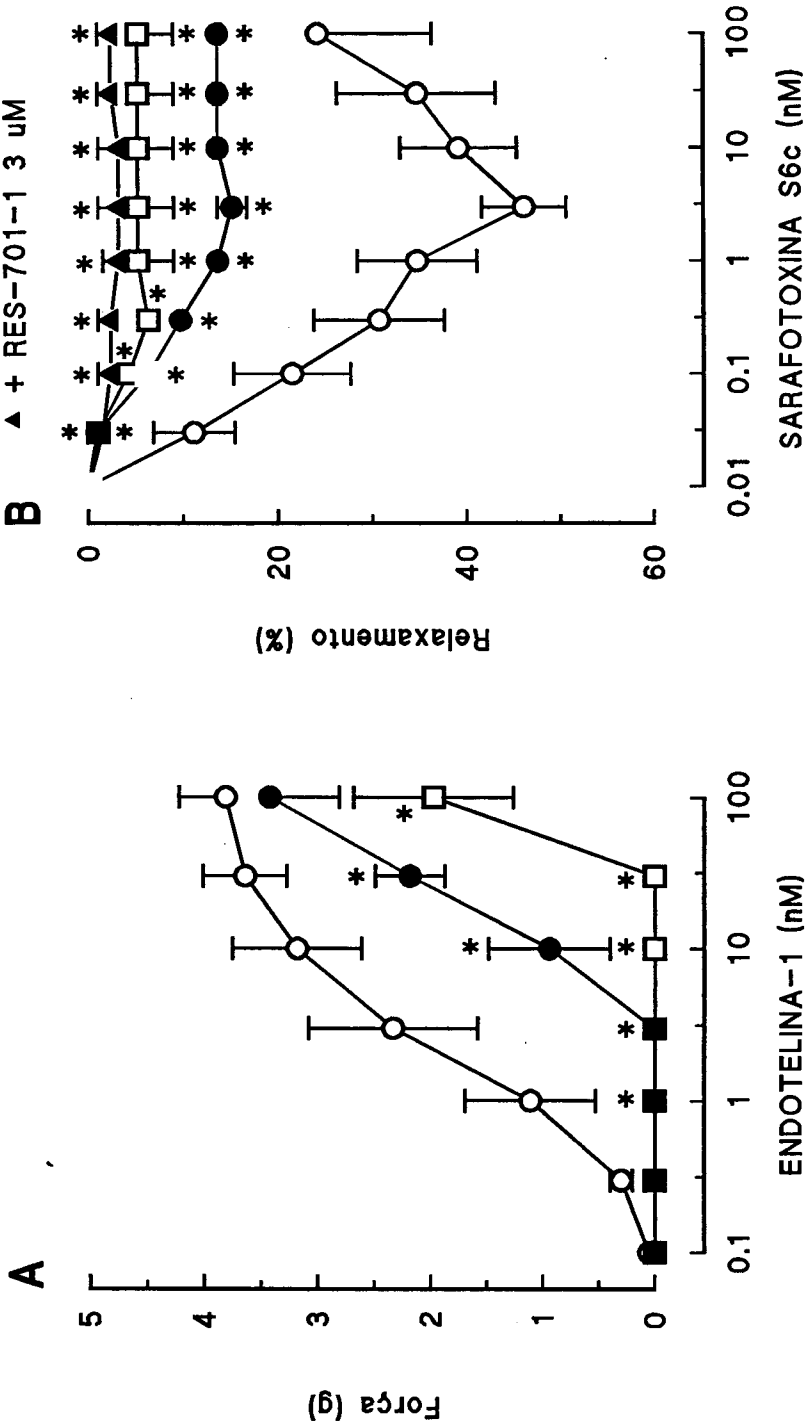
**TABELA 2** - Respostas médias de tiras de vesícula biliar isolada de cobaia a agonistas de receptores endotelinérgicos. As  $CE_{50}$ s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. Os  $E_{máx}$ s dos agonistas estão expressos como a média  $\pm$  E. P. M., como porcentagens relativas à reatividade de cada preparação ao KCl 80 mM. O termo “*n. d.*” indica valor não determinado devido ao efeito máximo não ter sido alcançado. O valor de “n” indica o número de experimentos. <sup>a</sup>Contração induzida por 100 nM de agonista. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao valor correspondente à ET-1 (teste t de Student, não pareado).

AGONISTA	$CE_{50}$ nM	$E_{máx}$ (%)	n
Endotelina-1	1,7 (0,6-5,3)	129 $\pm$ 10	6
Endotelina-2	6,4 (2,5-15,8)	137 $\pm$ 4	4
Endotelina-3	6,3 (3,7-10,7)	130 $\pm$ 8	6
Sarafotoxina S6c	1,5 (0,8-2,8)	103 $\pm$ 6*	7
IRL 1620	<i>n.d.</i>	65 $\pm$ 9 <sup>a,*</sup>	5

#### 4.4- Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos

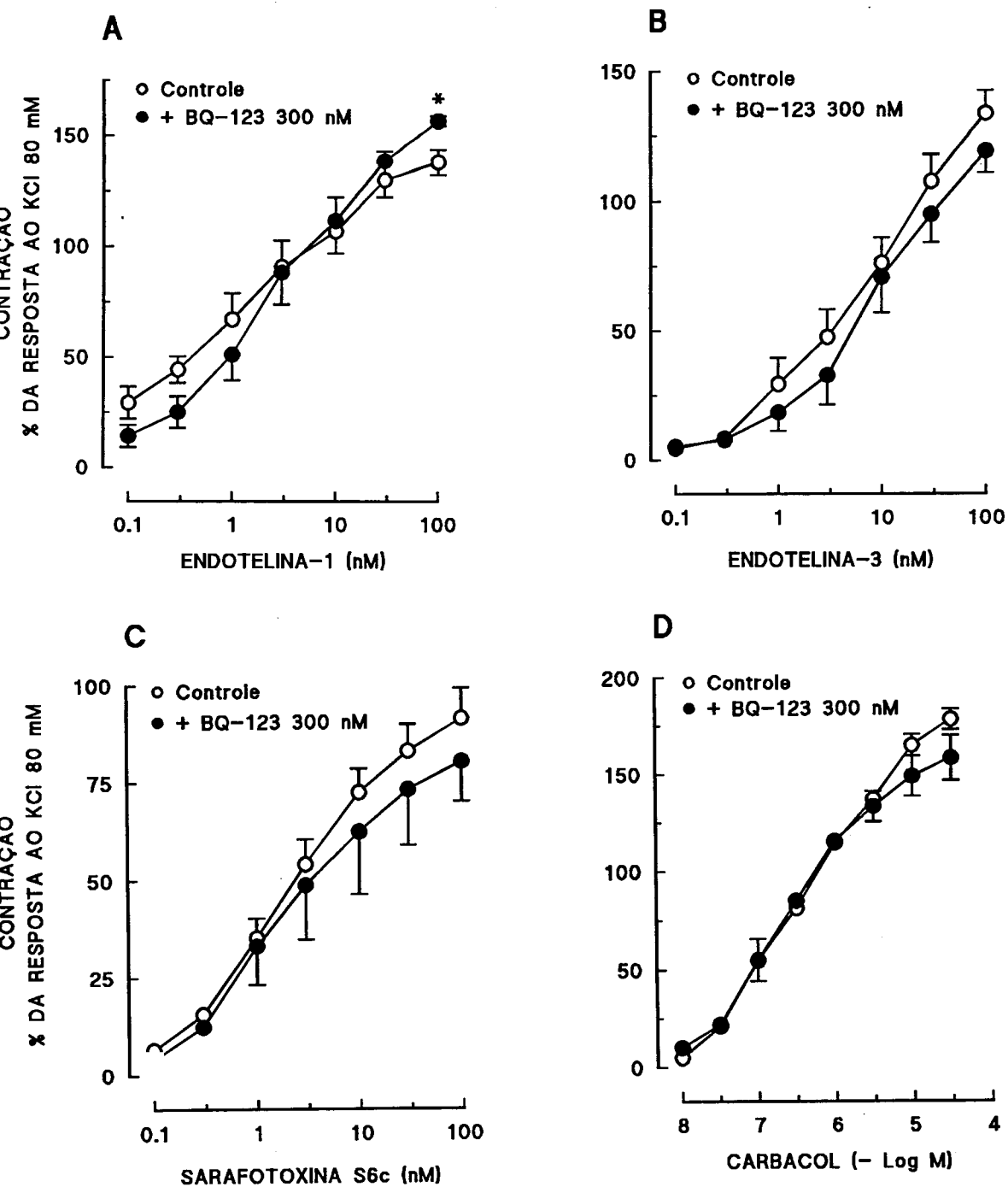
A atividade das amostras dos antagonistas utilizados na vesícula biliar de cobaia foi testada, inicialmente, em anéis de aorta torácica de rato com ou sem endotélio. A incubação de anéis de aorta sem endotélio com BQ-123 (300 nM), antagonista seletivo de receptores do tipo  $ET_A$ , ou bosentan (1  $\mu$ M), antagonista não-seletivo de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , deslocou significativamente à direita a curva concentração-resposta a ET-1 (Figura 7A). Da mesma forma, o bosentan (1  $\mu$ M) e os antagonistas seletivos de receptores do tipo  $ET_B$ , o BQ-788 (1 $\mu$ M) e o RES-701-1 (3  $\mu$ M), inibiram significativamente o relaxamento produzido pela sarafotoxina S6c em anéis de aorta de rato com endotélio contraídos com fenilefrina (100 nM) (Figura 7B).

A incubação de tiras de vesícula biliar isolada de cobaia com o BQ-123 (300 nM), por 20 min, não inibiu significativamente as curvas concentração-efeito aos efeitos contráteis da ET-1, ET-3 ou sarafotoxina S6c (Figuras 8A, 8B e 8C, respectivamente). As  $CE_{50}$ s (médias geométricas e limites de confiança para 95%) para cada um desses agonistas foram de 1,2 nM (0,5-3,1) e 2,6 nM (0,9-8,1) para ET-1; de 6,6 nM (3,3-12,9) e 7,3 nM (3,3-15,9) para ET-3; e de 1,9 nM (1,2-3,0) e 2,2 nM (0,3-18,1) para sarafotoxina S6c, na ausência e na presença de BQ-123 respectivamente ( $P > 0,05$  em todos os casos;  $n = 5$ ). Verificou-se, ainda, que o BQ-123 (300 nM) não modificou a resposta da preparação ao carbacol (Figura 8D), mas provocou um aumento discreto, porém significativo, da resposta induzida por 100 nM de ET-1 (Figura 8A).



**FIGURA 7** - Influência de diversos antagonistas de receptores endotelinérgicos nos efeitos contráteis da ET-1 (A), e nos efeitos relaxantes (vasodilatadores) da sarafoxina S6c (B) em anéis de aorta torácica de rato. Os experimentos ilustrados em "A" foram realizados em preparações sem endotélio. Os experimentos ilustrados em "B" foram realizados em preparações com endotélio contraídas com fenilefrina (100 nM). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste "t" bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média ± E. P. M. de 3 experimentos e asteriscos denotam  $P \leq 0,05$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle.

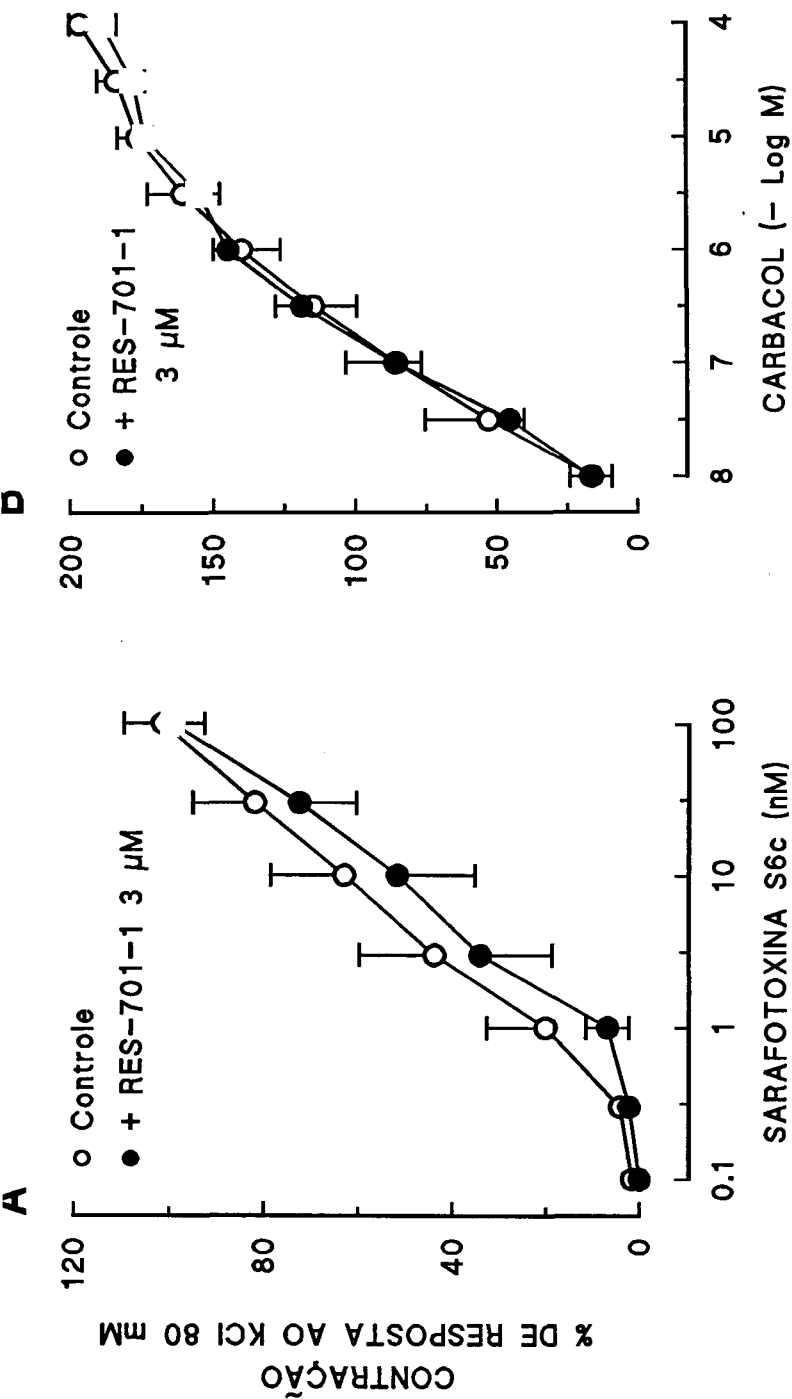




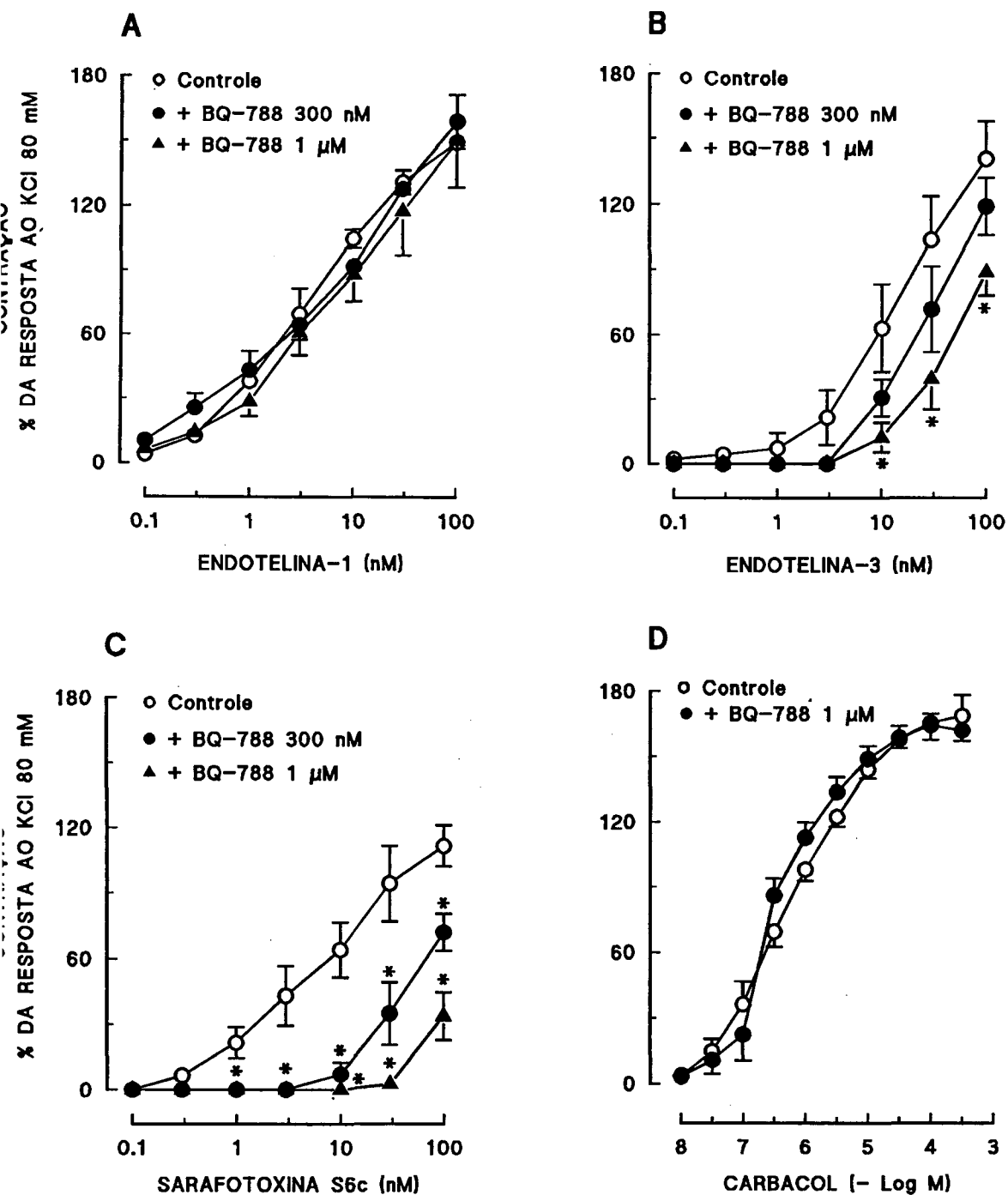
**FIGURA 8** - Influência do BQ-123 (300 nM), um antagonista seletivo para receptores do tipo  $ET_A$ , sobre os efeitos contráteis da ET-1 (A), ET-3 (B), sarafotoxina S6c (C) e carbacol (D) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Cada valor representa a média  $\pm$  E. P. M. de 5 experimentos. O asterisco denota  $P \leq 0,05$  quando comparado ao valor controle correspondente (teste "t" de Student).

A exemplo do observado com o BQ-123, a incubação por 20 min com o RES-701-1 (3  $\mu\text{M}$ ), antagonista seletivo de receptores do tipo  $\text{ET}_B$ , também não afetou as respostas induzidas pela sarafotoxina S6c ou carbacol (Figura 9A e 9B, respectivamente). Por outro lado, o BQ-788 (300 nM e 1  $\mu\text{M}$ ), outro antagonista seletivo de receptores do tipo  $\text{ET}_B$ , antagonizou as respostas contráteis produzidas pela ET-3 (Figura 10B) e sarafotoxina S6c (Figura 10C) de modo dependente de concentração, mas não alterou a curva concentração-efeito à ET-1 (Figura 10A). A especificidade de ação do BQ-788 em receptores endotelinérgicos foi confirmada pela ausência de efeitos do antagonista na curva concentração-efeito ao carbacol (Figura 10D).

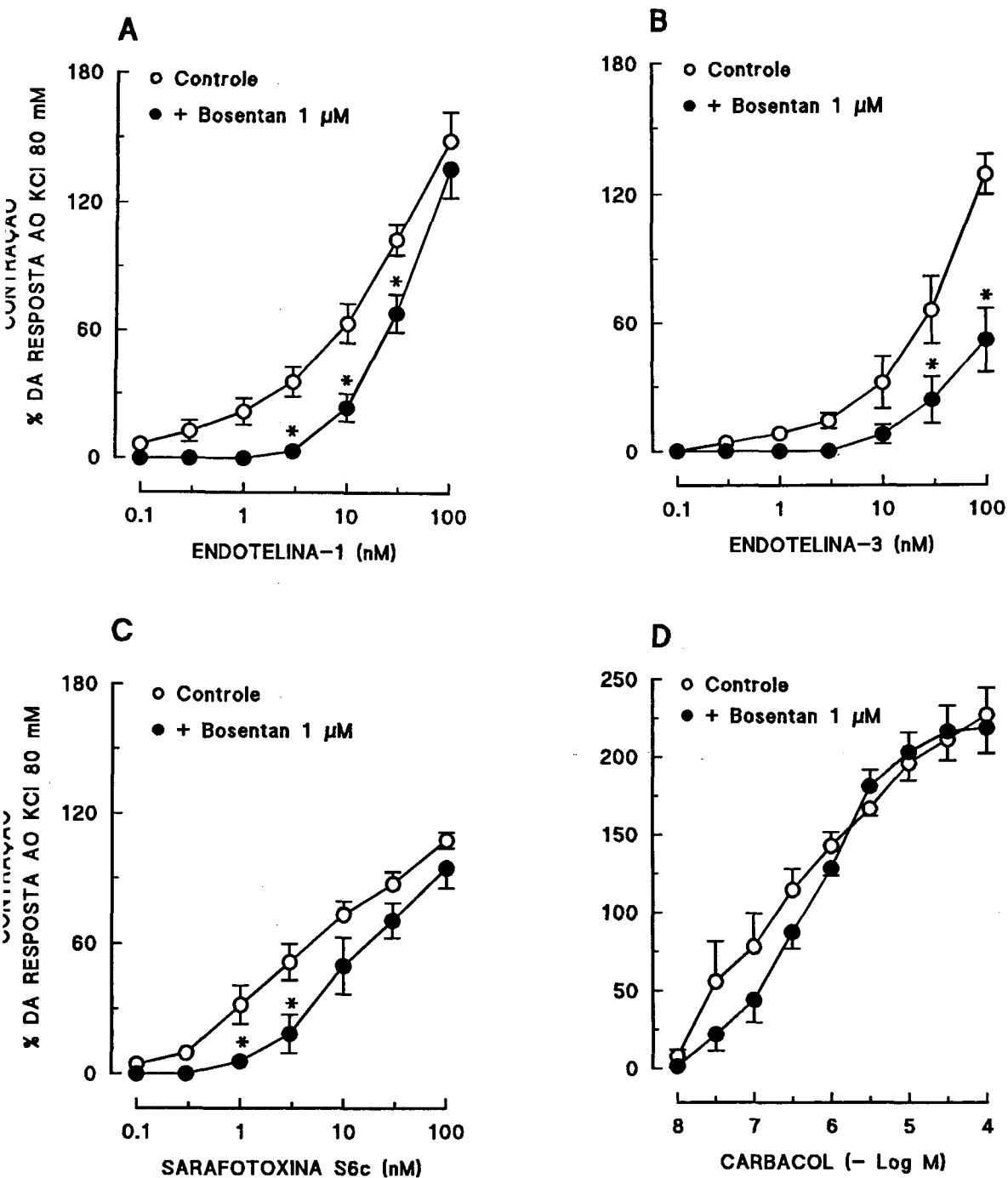
A incubação da preparação por 20 min com bosentan (1  $\mu\text{M}$ ), antagonista não-seletivo de receptores endotelinérgicos (i.e. bloqueador de receptores  $\text{ET}_A$  e  $\text{ET}_B$ ), diminuiu a resposta da vesícula biliar de cobaia à ET-1 e à ET-3 (Figuras 11A e 11B) e mais discretamente à sarafotoxina S6c (Figura 11C). Como esses experimentos não permitiram evidenciar, claramente, os  $E_{\text{máx}}$ s da ET-1 ou da ET-3 na presença do bosentan, não foi possível determinar os efeitos do antagonista sobre as  $\text{CE}_{50}$ s desses agonistas. No entanto, os efeitos do bosentan pareceram ser específicos, uma vez que, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , essa droga não modificou a resposta da preparação ao carbacol (Figura 11D).



**FIGURA 9** - Influência do RES-701-1 (3  $\mu$ M), um antagonista seletivo para receptores do tipo ET<sub>B</sub>, sobre os efeitos contráteis da sarafotoxina S6c (A) e carbacol (B) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Cada valor representa a média  $\pm$  E. P. M. de 3 a 4 experimentos (teste "t" de Student).



**FIGURA 10** - Influência do BQ-788 (300 nM ou 1 μM), um antagonista seletivo para receptores do tipo ET<sub>B</sub>, sobre os efeitos contráteis da ET-1 (A), ET-3 (B), sarafotoxina S6c (C) e carbacol (D) em tiras de vesícula biliar isolada de cobraia. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média ± E. P. M. de 4 experimentos e asteriscos denotam  $P \leq 0,05$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle.

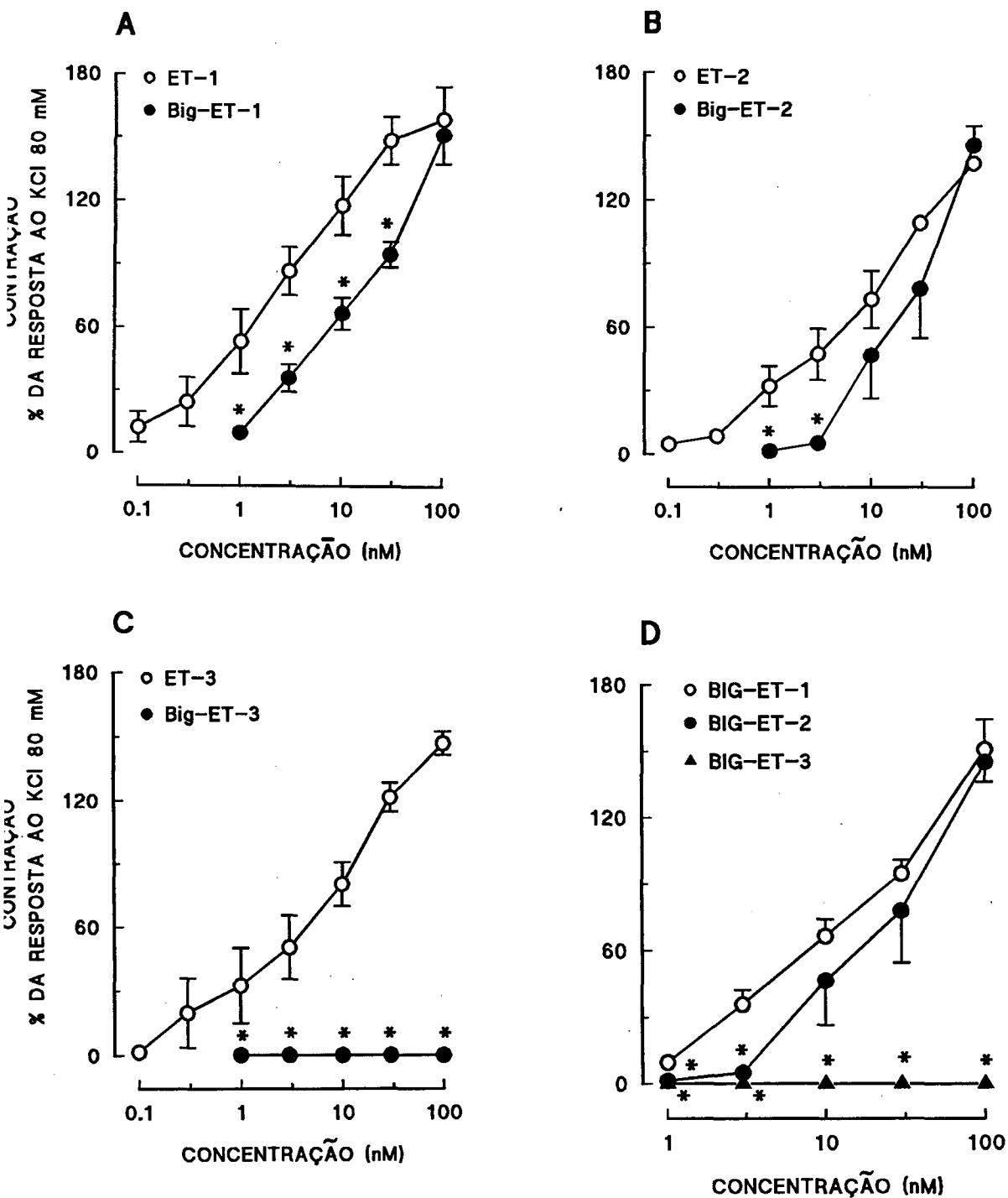


**FIGURA 11** - Influência do bosentan (1  $\mu$ M), um antagonista não-seletivo de receptores dos tipos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, sobre os efeitos contráteis da ET-1 (A), ET-3 (B), sarafotoxina S6c (C) e carbacol (D) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Cada valor representa a média  $\pm$  E. P. M. de 3 a 4 experimentos. Os asteriscos denotam  $P \leq 0,05$  quando o valor é comparado ao valor controle correspondente (teste "t" de Student).

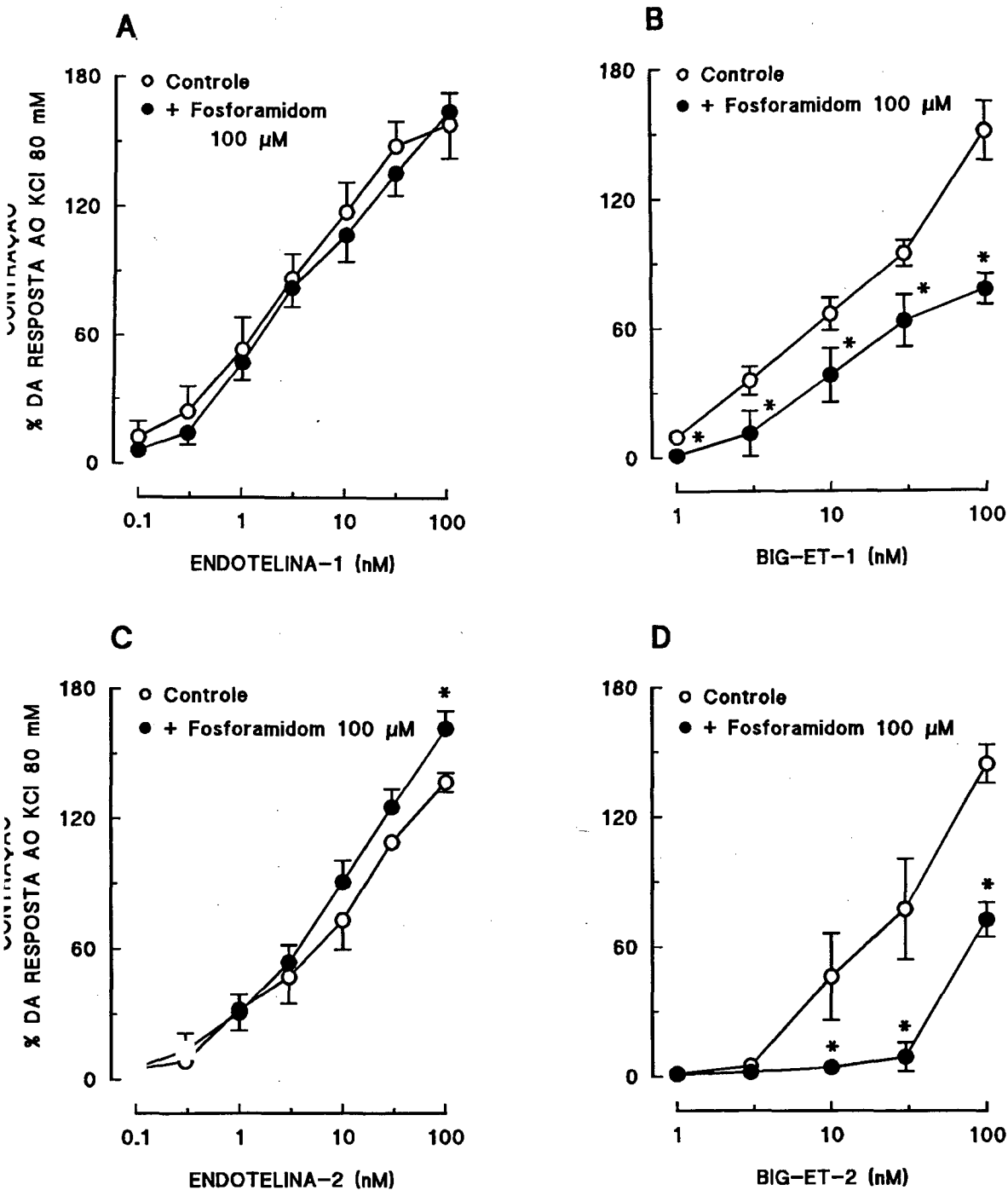
#### 4.5 Efeitos da big-ET-1, big-ET-2 e big-ET-3 na vesícula biliar de cobaia

A big-ET-1 e a big-ET-2 (1-100 nM), precursores imediatos da ET-1 e da ET-2, respectivamente, mostraram-se equiefetivas em contrair a vesícula biliar isolada de cobaia, causando respostas de  $151 \pm 13\%$  e  $145 \pm 9\%$ , respectivamente, na maior concentração testada (100 nM) (Figura 12D). Contudo, tanto a big-ET-1 quanto a big-ET-2 foram menos potentes que seus respectivos metabólitos ativos (Figuras 12A e 12B), e as respostas a ambos os precursores foram consideravelmente mais lentas. Por outro lado, a big-ET-3 (1-100 nM), precursor imediato da ET-3, mostrou-se inativa até a concentração de 100 nM (Figuras 12C e 12D). Além disso, é oportuno mencionar que a retirada da mucosa da vesícula biliar não alterou os efeitos contráteis induzidos pela ET-1 ou big-ET-1 ( $n = 4$ ; dados não apresentados).

A pré-incubação com o inibidor de metaloproteases fosforamidom (100  $\mu\text{M}$ ), por 45 min, reduziu as respostas contráteis à big-ET-1 e à big-ET-2 (Figuras 13B e 13D), mas não alterou a reatividade da preparação à ET-1 (Figura 13A) e aumentou as respostas a 100 nM de ET-2 (Figura 13C) ou ET-3 ( $n = 4$ ; resultados não apresentados). A big-ET-2 foi mais sensível ao bloqueio pelo fosforamidom do que a big-ET-1.



**FIGURA 12** - Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da big-endotelina-1 (A), big-endotelina-2 (B) e big-endotelina-3 (C), e seus respectivos metabólitos ativos na vesícula biliar isolada de cobaia. O painel "D" compara os efeitos dos 3 precursores. Cada valor representa a média  $\pm$  E. P. M. de 4 experimentos. Os asteriscos denotam  $P \leq 0,05$  quando o valor é comparado ao valor obtido com a mesma concentração do metabólito ativo correspondente (A, B ou C) ou de big-endotelina-1 (D) (teste "t" de Student).



**FIGURA 13** - Influência do fosforamidom (100 μM), um inibidor de metaloproteases, sobre os efeitos contráteis da ET-1 (A), big-ET-1 (B), ET-2 (C) ou big-ET-2 (D) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. O fosforamidom (ou veículo) foi incubado 45 min antes de iniciar a curva ao agonista. Cada valor representa a média ± E. P. M. de 4 experimentos. Os asteriscos denotam  $P \leq 0,05$  quando o valor é comparado ao valor controle correspondente (teste "t" de Student).



## 5 - DISCUSSÃO

A ET-1 causou contrações lentas e sustentadas da vesícula biliar, que foram dependentes da concentração e resistentes a sucessivas renovações da solução nutriente. Comparada com outros agonistas contráteis testados nessa preparação, a ET-1 mostrou-se equipotente à CCK-8, ao nível da  $CE_{50}$ , mas foi 290 e 1000 vezes mais potente que o carbacol e histamina, respectivamente. Por outro lado, os  $E_{máx}$ s da histamina e do carbacol foram significativamente maiores (cerca de 33%) que os da ET-1 e do CCK-8. Além disso, ao contrário da ET-1, os demais agonistas induziram contrações muito mais rápidas da preparação, embora também fossem respostas sustentadas, e seus efeitos foram revertidos rapidamente após a lavagem das preparações. Esses resultados são bastante semelhantes aos obtidos por Moumami *et al.* (1992b), embora esses autores tenham detectado uma potência discretamente maior da CCK-8 sobre a da ET-1.

Cabrini *et al.* (1995) evidenciaram contração concentração-dependente bifásica para a bradicinina na vesícula biliar de cobaia. A  $CE_{50}$  para a primeira fase foi de cerca de 1,3 pM, i.e. aproximadamente 1000 vezes menor que a determinada para a ET-1, mas o  $E_{máx}$  da bradicinina foi consideravelmente menor que o obtido pela ET-1. Por outro lado, esses autores também verificaram que o

tromboxanomimético U46619 apresentou potente resposta contrátil nessa preparação, com potência maior que as das prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ou  $E_2$ , mas semelhante à aquela observada para a ET-1 no presente estudo. Assim sendo, a ET-1 parece ser um dos agonistas contráteis mais potentes da vesícula biliar de cobaia, ao lado da CCK-8, bradicinina e U46619, que produzem seus efeitos através de receptores dos tipos  $CCK_A$ ,  $B_2$  e TP, respectivamente (Grider e Makhoulf, 1987; Cabrini *et al.*, 1995).

Moumami *et al.* (1992b) verificaram que as respostas contráteis da vesícula biliar de cobaia à ET-1 não são inibidas pela tetrodotoxina, neurotoxina que inibe a condução de potenciais de ação neuronais por bloqueio seletivo de canais neuronais rápidos de sódio, pela atropina ou pela  $\omega$ -conotoxina, essa última inibidora da exocitose de neurotransmissores por bloqueio de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo N. Tais achados sugerem que a ET-1 contrai a vesícula biliar de cobaia por ação direta sobre a musculatura lisa. Segundo Takahashi *et al.* (1991), tanto a atropina como a vagotomia diminuem a reatividade da preparação à CCK-8, mas outros autores verificaram que a CCK-8 não induz a liberação de acetilcolina (Yau e Youther, 1984) ou que a escopolamina, atropina ou tetrodotoxina não alteram a contração da vesícula causada pela CCK-8 (Rakovska *et al.*, 1986; Grider e Makhoulf, 1987). Assim, os mecanismos envolvidos no efeito contrátil induzido

pela CCK-8 na vesícula biliar de cobaia ainda não são claros (Schjoldager, 1993).

Por outro lado, a atropina e a tetrodotoxina parecem não modificar as contrações da vesícula biliar de cobaia induzidas pela bradicinina (Cabrini *et al.*, 1995).

Parte do presente estudo procurou caracterizar alguns dos possíveis mecanismos celulares pelos quais a ET-1 contrai a vesícula biliar isolada de cobaia. Nesse sentido, verificou-se que esse efeito depende, fortemente, do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que a ausência do cátion da solução nutriente praticamente aboliu a resposta ao peptídeo. Além disso, a reintrodução do  $\text{Ca}^{2+}$  na solução, após a adição de ET-1 (30 nM) em solução nutriente sem  $\text{Ca}^{2+}$ , prontamente restabeleceu a resposta da preparação à ET-1 aos níveis apresentados por preparações controle. Parte desse influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido pela ET-1 é claramente mediado pela ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem do tipo L, pois a nicardipina, um bloqueador desses canais, provocou inibição dependente de concentração das respostas à ET-1. No entanto, mesmo preparações incubadas com nicardipina (10  $\mu\text{M}$ ) ainda responderam à ET-1 com contrações que foram cerca de 40 a 50% daquelas apresentadas em condições normais, porém maiores do que as obtidas em solução sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, parece que a ET-1 também induz um influxo adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  através de outros canais dependentes de voltagem resistentes a nicardipina,

canais não-seletivos (Van Renterghem *et al.*, 1988), ou ainda canais operados por receptores endotelinérgicos (Chan e Greenburg, 1991).

Resultados semelhantes a esses foram obtidos, na mesma preparação, com relação aos efeitos da nicardipina e o diltiazem, outro bloqueador de canais do tipo L, sobre contrações induzidas pela ET-1 (Moumami *et al.*, 1992b). Por outro lado, estudo eletrofisiológico realizado em células musculares lisas isoladas da vesícula biliar de cobaia, utilizando a técnica de *patch clamp*, demonstraram a presença, quase que exclusiva, de correntes de íons  $\text{Ca}^{2+}$  típicas de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, bem como a ausência de canais do tipo T (Shimada, 1993). As contrações induzidas pela ET-1 em várias preparações também dependem, fortemente, do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais do tipo L. Entre essas estão a artéria coronária suína (Yanagisawa *et al.*, 1988), útero de rata (Kosuka *et al.*, 1989; pelo menos as contrações rítmicas), bexiga de coelho e porco (Garcia-Pascual *et al.*, 1990; Persson *et al.*, 1992), íleo de cobaia (Guimarães e Rae, 1992) e fundo do estômago de rato (Fulginiti *et al.*, 1993). Porém, cumpre ressaltar que há também tecidos nos quais as contrações causadas pela ET-1 praticamente independem ou dependem pouco da ativação de canais do tipo L, como a veia jugular de coelho (D'Orleans-Juste *et al.*, 1989), a aorta torácica de rato (Auguet *et al.*, 1988), útero de rata (Calixto e Rae, 1991; contração tônica) e traquéia de cobaia (Maggi *et al.*, 1989).

As ETs podem estimular a liberação de eicosanóides da via da cicloxigenase (prostanóides) em vários tecidos (para revisão ver Hyslop e De Nucci, 1992). Tal atividade contribui para reduzir os efeitos contráteis da ET-1 em alguns tecidos, como o baço e rim de coelho (Rae *et al.*, 1989), ou o leito coronariano de cobaia (Folta *et al.*, 1989). Em outros tecidos como a traquéia de cobaia (Filep *et al.*, 1991b), as contrações produzidas pela ET-1 são mediadas em parte pela liberação de prostanóides. No presente estudo, a incubação de tiras de vesícula biliar de cobaia com indometacina, um inibidor da cicloxigenase, reduziu significativamente a reatividade da preparação à ET-1. No entanto, Moumami *et al.* (1992b) observaram apenas uma tendência não significativa à inibição das respostas da mesma preparação à ET-1. As razões para tal discrepância não são aparentes. Porém, no presente estudo confirmamos os resultados obtidos com a indometacina utilizando o ibuprofeno, outro inibidor da cicloxigenase. Assim, uma fração significativa do efeito contrátil da ET-1 na vesícula biliar isolada de cobaia parece depender da síntese de prostanóides, embora não esteja claro se esses mediadores atuam diretamente ou se apenas modulam (i.e. facilitam) as respostas do tecido ao peptídeo.

Parece pertinente mencionar, novamente, que o tromboxanomimético U46619 é muito mais potente em contrair a vesícula biliar de cobaia que as

prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ou  $E_2$  (Cabrini *et al.*, 1995). Seria interessante testar, no futuro, se a ET-1 e demais ETs efetivamente induzem liberação de tromboxano  $A_2$  nesse tecido. Por outro lado, a bradicinina também induz contrações da vesícula biliar que são reduzidas por inibidores de cicloxigenase (Cabrini *et al.*, 1995). Contudo, nem todos os agonistas dependem de prostanóides para contrair essa preparação, pois a indometacina não afetou as respostas induzidas pelo carbacol ( $\geq 300$  nM; resultados não apresentados).

Uma parte substancial do presente estudo teve por objetivo caracterizar os receptores endotelinérgicos que medeiam as contrações da vesícula biliar de cobaia em resposta às ETs. Para atingir esse objetivo, procurou-se fazer uso de duas abordagens distintas: a) a comparação das atividades de diferentes agonistas de receptores endotelinérgicos; e b) uma análise das influências de antagonistas de receptores endotelinérgicos nas curvas concentração-efeito a diferentes agonistas.

### **Caracterização de receptores com agonistas**

Com relação à primeira abordagem, convém lembrar que, até o presente, foram clonados apenas dois receptores endotelinérgicos dos genomas de mamíferos: o receptor  $ET_A$ , que apresenta maior afinidade pela ET-1 e ET-2 do que pela ET-3 (Arai *et al.*, 1990); e o receptor  $ET_B$ , que não discrimina entre esses três

isopeptídeos e é ativado seletivamente por alguns agonistas, como a sarafotoxina S6c, o IRL 1620 e o BQ-3020 (Sakurai *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991; Takai *et al.*, 1992; Ihara *et al.*, 1992).

A ET-1, a ET-2 e a ET-3 mostraram-se equipotentes (ao nível da  $CE_{50}$ ) e equiefetivas em contrair a vesícula biliar isolada de cobaia. Esses resultados, portanto, sugerem que a vesícula biliar de cobaia contém receptores do tipo  $ET_B$ . Reforçando essa hipótese, verificou-se que tanto a sarafotoxina S6c quanto o IRL 1620 foram também ativos em contrair a preparação. O IRL 1620, apesar de ativo, foi menos potente do que as demais ETs, confirmando estudos prévios realizados na aorta de rato (Karaki *et al.*, 1993) e na traquéia (Takai *et al.*, 1992) ou pulmão perfundido (D'Orléans-Juste *et al.*, 1994) isolados de cobaia. No entanto, embora a sarafotoxina S6c tenha-se mostrado equipotente às ETs, o efeito máximo do agonista foi significativamente menor que os das ETs. Essa discrepância, associada ao fato que a ET-1 ainda causa contração adicional em preparações expostas à concentração máxima efetiva de sarafotoxina S6c (Battistini *et al.*, 1994), sugere a existência de uma população heterogênea de receptores na vesícula biliar de cobaia. Perfis de ação semelhantes foram obtidos por Battistini *et al.* (1994) para as ETs e o IRL 1620, diferindo apenas nos resultados registrados pela sarafotoxina S6c, que apresentou potência e eficácia menores que as da ET-1. Esse mesmo trabalho

também avaliou a atividade de outros três agonistas seletivos de receptores  $ET_B$ : o BQ-3020, a [Ala<sup>1,3,11,15</sup>]ET-1 e a ET (16-21). Os dois primeiros mostraram-se ainda menos potentes do que o IRL 1620 e o último foi inativo até 10  $\mu$ M.

### **Caracterização de receptores com antagonistas**

A segunda abordagem visando à caracterização dos receptores endotelinérgicos avaliou os perfis de ação de agonistas na presença de diferentes antagonistas de receptores endotelinérgicos. Para isso, utilizamos os seguintes antagonistas: BQ-123, antagonista seletivo de receptores do tipo  $ET_A$  (Ihara *et al.*, 1992); RES-701-1 e BQ-788, antagonistas seletivos de receptores do tipo  $ET_B$  (Tanaka *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 1994) e o bosentan, antagonista não-seletivo de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  (Clozel *et al.*, 1994).

Inicialmente avaliamos a participação dos receptores  $ET_A$ , sensíveis ao bloqueio pelo BQ-123, na resposta contrátil induzida pelas ETs na vesícula biliar de cobaia. Os nossos achados revelaram que o BQ-123 (300 nM) não modificou as curvas concentração-efeito contráteis induzidas pela ET-3 ou sarafotoxina S6c. O antagonista também não alterou a potência da ET-1, embora tenha provocado um aumento discreto, porém significativo, do  $E_{m\acute{a}x}$  induzido pelo agonista. A ausência de efeito inibitório do BQ-123 na vesícula biliar não se deve à falta de atividade da



amostra utilizada, pois, confirmando a literatura, o BQ-123 mostrou-se capaz de antagonizar, na concentração de 300 nM, o efeito constritor da ET-1 na aorta torácica de rato. Battistini *et al.* (1994) demonstraram que o BQ-123 na concentração de 10  $\mu$ M, não alterou a reatividade da vesícula biliar de cobaia à ET-1, porém inibiu a contração induzida por ET-3 (300 nM) em cerca de 70%. Em concentração ainda mais elevada, o BQ-123 (100  $\mu$ M) também reduziu as contrações induzidas pela ET-1 e sarafotoxina S6c. Contudo, convém salientar que as concentrações de BQ-123 utilizadas por Battistini *et al.* (1994) foram extremamente elevadas, e podem ter comprometido a seletividade de ação da droga em receptores do tipo ET<sub>A</sub>. De fato, já foi demonstrado que o BQ-123, na concentração de 100  $\mu$ M, inibe marcadamente a ligação de ET-1 radioiodinada a receptores ET<sub>B</sub> (Williams *et al.*, 1993). Dessa maneira, os nossos achados parecem sugerir, fortemente, que os receptores do tipo ET<sub>A</sub>, sensíveis ao bloqueio pelo BQ-123, não estão envolvidos na mediação da resposta contrátil induzida pelas ETs na musculatura lisa da vesícula biliar de cobaia.

Considerando a sugestão do envolvimento de receptores ET<sub>B</sub> nos efeitos contráteis das ETs nessa preparação, a partir da comparação das atividades de diferentes agonistas de receptores endotelinérgicos, fizemos uso do RES-701-1 (Tanaka *et al.*, 1994) e do BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1994), ambos potentes

antagonistas seletivos de receptores ET<sub>B</sub>. A incubação da preparação com o RES-701-1 (3 µM), antagonista obtido a partir da cultura do *Streptomyces* sp, falhou em antagonizar as respostas da vesícula biliar isolada de cobaia à sarafotoxina S6c. Ao contrário, o BQ-788 (300 nM e 1 µM) antagonizou as respostas contráteis produzidas pela ET-3 e sarafotoxina S6c de modo concentração-dependente, mas não alterou a curva concentração-efeito à ET-1. Entretanto, as concentrações usadas em nossos experimentos do RES-701-1 (3 µM) e BQ-788 (1 µM) foram suficientes para inibirem de forma pronunciada o relaxamento causado pela sarafotoxina S6c em aorta torácica de rato contraída com 100 nM de fenilefrina. Nesse sentido, os resultados obtidos na aorta de rato reproduzem, essencialmente, os achados de Karaki *et al.* (1994) quanto à eficiência do RES-701-1 nessa preparação. Esses autores também evidenciaram que, na concentração de 3 µM, o RES-701-1 antagonizou os efeitos contráteis do IRL 1620, outro agonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub>, na traquéia isolada de coelho, aumentando a CE<sub>50</sub> em 74 vezes. O BQ-788 (10 nM), por sua vez, quase que aboliu a liberação de tromboxano A<sub>2</sub> induzida pela ET-1 ou IRL 1620 em pulmão perfundido de cobaia (D'Orléans-Juste *et al.*, 1994), assim como o influxo de Ca<sup>2+</sup> causado pela ET-1 e a ligação de ET-1 marcada a sítios com características de receptores do tipo ET<sub>B</sub> em células Girardi do coração humano (Ishikawa *et al.*, 1994).

Diversos estudos têm sugerido a existência de subtipos de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ . Nesse sentido, Warner *et al.* (1993) verificaram que o PD 142893, antagonista não-seletivo de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , foi capaz de inibir a vasodilatação (mediada por receptores  $ET_B$ ) induzida pela ET-1 ou sarafotoxina S6c na artéria mesentérica perfundida de rato, mas não as contrações induzidas por esses agonistas em artéria pulmonar de coelho ou tiras de estômago de rato. Também Sudjarwo *et al.* (1993; 1994) propuseram a ocorrência de dois subtipos de receptor  $ET_B$ ,  $ET_{B1}$  e  $ET_{B2}$ , nas veias pulmonar de porco e safena de coelho, além de dois subtipos de receptor  $ET_A$ ,  $ET_{A1}$  e  $ET_{A2}$ . Essa proposta baseou-se principalmente na diferença pronunciada nas atividades da ET-1, ET-3 e dos agonistas seletivos de receptores  $ET_B$ , sarafotoxina S6c e IRL 1620, nessas preparações, bem como nas susceptibilidades distintas dos efeitos desses agonistas a inibição por um mesmo antagonista. Assim, os receptores do subtipo  $ET_{B1}$  apresentariam alta afinidade pela sarafotoxina S6c, IRL 1620, RES-701-1, enquanto que o subtipo  $ET_{B2}$  apresentaria maior afinidade pela sarafotoxina S6c do que pelo IRL 1620, não sendo sensível ao bloqueio por RES-701-1. Recentemente, Douglas *et al.* (1995) confirmaram a existência de subtipos de receptores  $ET_B$  na veia safena (lateral) de coelho, e foram mais além constatando que os receptores do subtipo  $ET_{B1}$  estão localizados no endotélio vascular mediando a ação vasodilatadora das ETs, enquanto que os  $ET_{B2}$  ficam situados na musculatura lisa vascular e medeiam a resposta contrátil. A

traquéia isolada de coelho e de cobaia também apresentam o receptor do subtipo  $ET_{B1}$ , sensível ao bloqueio pelo RES-701-1 e BQ-788, e o subtipo  $ET_{B2}$ , bloqueado apenas pelo BQ-788 (Yoneyama *et al.*, 1995).

Considerando que, no presente estudo, a sarafotoxina S6c mostrou-se mais potente do que o IRL 1620 em contrair a vesícula biliar de cobaia, e que o BQ-788, mas não o RES-701-1, bloqueou as contrações induzidas por sarafotoxina S6c e ET-3, podemos sugerir que pelo menos parte dos receptores endotelinérgicos nessa preparação são do subtipo  $ET_{B2}$ .

O fato de as contrações induzidas pela ET-1 não terem sido bloqueadas por nenhum dos antagonistas utilizados, levou-nos a testar a influência do bosentan (Ro 47-0203), um antagonista não-peptídico e não-seletivo de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  (Clozel *et al.*, 1994). A incubação com bosentan (1  $\mu$ M), inibiu, especificamente, a reatividade da vesícula biliar de cobaia tanto à ET-1 quanto à ET-3, e mais discretamente à sarafotoxina S6c, sem alterar as respostas ao carbacol. Resultados obtidos por Battistini *et al.* (1994), na mesma preparação, com um outro antagonista não-seletivo de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , o PD 145065 (10  $\mu$ M), mostraram que esse antagonista foi mais potente em antagonizar a respostas à ET-3 do que à ET-1. Experimentos adicionais realizados em nossos laboratórios permitiram verificar que essa concentração de bosentan (1  $\mu$ M) foi suficiente para antagonizar o efeito

contrátil da ET-1 em aorta torácica de rato sem endotélio, bem como o relaxamento induzido pela sarafotoxina S6c em aorta de rato com endotélio pré-contraída com 100 nM de fenilefrina.

Tem sido sugerido que, além da possível coexistência de subtipos de receptores  $ET_{B1}$  e  $ET_{B2}$  na veia safena e traquéia de coelho, bem como na traquéia de cobaia, tais tecidos também expressam dois subtipos de receptores  $ET_A$  (Sudjarwo *et al.*, 1994; Yoneyama *et al.*, 1995). O receptor de subtipo  $ET_{A1}$  apresentaria maior afinidade pela ET-1 do que pela ET-3 e alta afinidade pelo BQ-123. Os resultados obtidos na vesícula biliar de cobaia com o bosentan poderiam sugerir que a ET-1 ativa receptores endotelinérgicos do tipo  $ET_{A2}$  sensíveis ao bloqueio por bosentan, mas não por BQ-123, RES-701-1 ou BQ-788. Por outro lado, o bloqueio das contrações induzidas pela ET-3 e sarafotoxina S6c, que não exibiriam afinidade por receptores  $ET_{A2}$ , refletiria a capacidade do bosentan em bloquear receptores  $ET_{B2}$ . Estudos adicionais são claramente necessários para reforçar essa hipótese.

A teoria clássica de antagonismo competitivo postula que um antagonista, que atue num único receptor, reduz igualmente a afinidade do receptor a todos os agonistas que interagem com esse receptor (Schild, 1949). Porém, Sakamoto *et al.* (1993) observaram que certas modificações estruturais do receptor  $ET_A$  reduzem

seletivamente sua afinidade pelo BQ-123, sem modificar a afinidade à ET-1 ou ET-3. De forma semelhante, Lee *et al.* (1994) relataram que uma quimera de receptor ET<sub>A</sub>, contendo fragmentos do receptor ET<sub>B</sub> correspondentes aos domínios transmembrana 4 a 6 e parte do 7, apresenta aumentos bem maiores de afinidade por agonistas seletivos de receptores ET<sub>B</sub>, do que o decréscimo verificado na afinidade pelo BQ-123. Ambos os estudos sugerem que o BQ-123, um antagonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>A</sub>, interage com domínios do receptor que são distintos daqueles envolvidos na associação de agonistas. Evidências semelhantes, que contestam os postulados da teoria clássica de antagonismo competitivo, também já foram obtidas em estudos conduzidos com outros receptores para mediadores peptídicos, como os receptores NK<sub>1</sub> para neurocininas (Fong *et al.*, 1993; Gether *et al.*, 1993a), o receptor CCK<sub>B</sub> para colecistocinina (Beinborn *et al.*, 1993) e receptores B<sub>2</sub> para a bradicinina (Hall, 1992). Por outro lado, também há evidências de que agonistas de receptores NK<sub>1</sub> podem ligar-se, em graus variáveis, com diferentes domínios do receptor (Gether *et al.*, 1993b). Talvez esse fato possa explicar porque, no caso específico de receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub>, o BQ-123 inibe mais facilmente as respostas à sarafotoxina S6b ou ET-3 do que à ET-1 em diversas preparações, como a aorta de rato (Sumner *et al.*, 1992), artéria cerebral de bode (Salom *et al.*, 1993), veias omentais (Riezebos *et al.*, 1994) e safena humanas (Bax *et al.*, 1993), bem como no canal deferente de rato (Eglezos *et al.*, 1993) e

camundongo (Maas *et al.*, 1995). Tal possibilidade poderia explicar também porque, no presente estudo, o BQ-788 antagonizou mais fortemente as respostas induzidas na vesícula biliar de cobaia pela sarafotoxina S6c do que pela ET-3, ambos agonistas que, segundo Sudjarwo *et al.* (1994) e Yoneyama *et al.* (1995), apresentariam baixa afinidade por receptores ET<sub>A2</sub>.

Finalmente, no nosso entendimento, há uma última hipótese que merece ser considerada, em vista dos resultados relatados por Fukuroda *et al.* (1994). Esses autores demonstraram que as contrações induzidas por ET-1 na artéria pulmonar de coelho não são inibidas pelo BQ-123 ou pelo BQ-788 (cada qual a 10 µM). No entanto, a associação dos dois antagonistas resulta em virtual supressão da resposta à ET-1. Foi concluído que o tecido apresenta tanto receptores ET<sub>A</sub> quanto ET<sub>B</sub> que medeiam contração, sendo que apenas o bloqueio simultâneo de ambos resulta em antagonismo dos efeitos da ET-1. Talvez uma situação análoga a essa pudesse explicar porque o bosentan, ao contrário do BQ-123, RES-701-1 ou BQ-788, foi capaz de antagonizar as contrações induzidas pela ET-1 na vesícula biliar de cobaia.

Em resumo, as evidências funcionais obtidas no presente estudo sugerem que a vesícula biliar de cobaia apresenta uma população heterogênea de receptores endotelinérgicos. Uma parte desses receptores parece ser do subtipo ET<sub>B2</sub>, enquanto a outra possivelmente corresponde a receptores do subtipo ET<sub>A2</sub>. No entanto, vários

aspectos quanto à natureza desses receptores e suas interações com agonistas e antagonistas permanecem a ser explorados mais profundamente.

### **Experimentos com ECE**

O último bloco de experimentos realizados no presente trabalho procurou evidenciar a presença de atividade conversora de ET na vesícula biliar de cobaia. Verificou-se que a big-ET-1 e a big-ET-2 (ambas de 1 a 100 nM), precursores imediatos respectivos da ET-1 e da ET-2, foram equiefetivas em contrair a vesícula biliar de cobaia. Por outro lado, a big-ET-3 (1-100 nM), precursor imediato da ET-3, mostrou-se inativa até a concentração de 100 nM. Embora não tenham sido obtidas curvas concentração-efeito completas aos precursores, a big-ET-1 e a big-ET-2 mostraram-se cerca de 3 a 10 vezes menos potentes do que seus metabólitos ativos correspondentes, comparando-se os efeitos de cada concentração submáxima de agonista ponto a ponto. Além disso, o fosforamidom (100  $\mu$ M), um inibidor de metaloproteases, reduziu parcialmente significativamente as respostas à big-ET-1 e à big-ET-2, mas não afetou aquelas à ET-1 e de fato potencializou as respostas induzidas por 100 nM de ET-2 ou ET-3.

Como a big-ET-1 compete muito fracamente com a ET-1 marcada por sítios de ligação específicos em membranas celulares obtidas desta preparação



(Battistini *et al.*, 1995), os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos contráteis dos precursores não são mediados através de uma ação direta sobre os receptores de ETs. Resultados semelhantes foram obtidos no ducto deferente de camundongo, onde também a big-ET-1 foi somente 10 vezes menos potente que a ET-1 na potencialização das contrações neurogênicas (Maas *et al.*, 1995), e no útero de rata não-grávido onde o precursor é apenas 7 vezes menos potente em causar contração tônica (Rae *et al.*, 1993). Ao contrário, nos vasos sanguíneos sem endotélio, a potência contrátil da big-ET-1 é cerca de 50 a 150 vezes menor que da ET-1 (Kashiwabara *et al.*, 1989) e 100 vezes menos potente em competir com a ET-1 marcada por sítios específicos de ligação em membranas de músculo liso vascular (Hirata *et al.*, 1990). O desenvolvimento das respostas à big-ET-1 e big-ET-2 foi consideravelmente mais lento que o desenvolvimento das respostas dos seus metabólitos ativos. Observações semelhantes foram feitas por Battistini *et al.* (1995) na mesma preparação e por Fukuroda *et al.* (1990) em artéria coronária isolada de porco. Esse conjunto de evidências sugere, fortemente, que as ações da big-ET-1 e da big-ET-2 na vesícula biliar de cobaia envolvem sua conversão nos seus respectivos metabólitos ativos pela ECE presente no tecido.

Conforme comentou-se na Introdução, há pelo menos duas ECEs codificadas por genes distintos, a ECE-1 e a ECE-2 (Xu *et al.*, 1994; Emoto e

Yanagisawa, 1995), e dados funcionais e bioquímicos apontam para a possível existência de isoenzimas da ECE-1 e outras ECEs (ver Introdução para referências). Pelas evidências obtidas no presente estudo e naquele realizado por Battistini *et al.* (1995), a vesícula biliar de cobaia parece apresentar uma ECE-1 que converte big-ET-1 e big-ET-2, mas não big-ET-3, exógenas. Embora o perfil de atividade funcional dessa enzima assemelhe-se mais ao da ECE-1b, pelo fato de não converter a big-ET-3, a conversão da big-ET-2 observada na vesícula biliar foi maior do que a detectada para a ECE-1b clonada por Shimada *et al.* (1994). De fato, esse peptídeo mostrou-se equipotente em relação à big-ET-1 e à big-ET-2 na indução de contrações da vesícula biliar. Estudos complementares serão necessários para corroborar a hipótese da ocorrência de ECE-1b nessa preparação. Além disso, a possível ocorrência de ECE-2 na vesícula biliar não pode ser descartada com base nos resultados até aqui obtidos, pois substratos administrados no meio extracelular não têm acesso a essa enzima intracelular (Emoto e Yanagisawa, 1995).

Tem sido evidenciado que células epiteliais cultivadas da vesícula biliar e do trato biliar intra- e extra-hepático humanos expressam RNAm para ET-1 e secretam quantidades apreciáveis do peptídeo, embora os níveis intracelulares de ET-1 madura sejam insignificantes (Housset *et al.*, 1993). Esse estudo poderia

sugerir que a atividade de ECE detectada na vesícula biliar de cobaia estaria localizada na mucosa do tecido, e não na camada muscular lisa. No entanto, curvas concentração-efeito contráteis à ET-1 e big-ET-1 realizadas em preparações sem mucosa não foram diferentes daquelas obtidas em tecidos montados com a camada mucosa intacta (isto é, com epitélio). Tais experimentos demonstram que há forte atividade da ECE na camada muscular lisa da vesícula biliar de cobaia, mas não excluem a possibilidade de que a enzima também esteja presente na camada mucosa.

A incubação com o inibidor de metaloproteases fosforamidom (100  $\mu$ M) aumentou as respostas da vesícula biliar a 100 nM de ET-2 ou ET-3, mas não de ET-1. É provável que estes aumentos reflitam uma ação inibitória do fosforamidom sobre a endopeptidase neutra 24.11 (NEP), uma enzima que metaboliza significativamente as ETs e seus precursores (Abassi *et al.*, 1992). Um estudo comparando a eficácia inibitória de análogos do fosforamidom sobre a ECE, NEP e enzima conversora de angiotensina revelou que a NEP 24.11 é mais sensível que a ECE à inibição pelo fosforamidom (Kukkola *et al.*, 1995). Esses resultados nos permitem sugerir que, na vesícula biliar de cobaia, a endopeptidase neutra 24.11 pode estar envolvida na inativação fisiológica da ET-2 e ET-3, e talvez em menor grau, na degradação da ET-1.

## **Implicações fisiológicas ou fisiopatológicas**

Conforme exposto acima, a vesícula biliar sintetiza ET-1 (Housset *et al.*, 1993) que, por sua vez, parece ser um agente contrátil extremamente potente nesse tecido (presente estudo; Battistini *et al.*, 1994). Além disso, a produção de ET-1 pelo epitélio biliar humano é aumentada pela CCK (Housset *et al.*, 1993). Apesar dessas evidências, não está claro se a ET-1 efetivamente participa na regulação da atividade dos diferentes componentes do trato biliar. A disponibilidade recente de antagonistas de receptores endotelinérgicos não-peptídicos, mais resistentes à degradação enzimática e ativos por via oral, talvez possa auxiliar na elucidação, dentro em breve, dos possíveis papéis fisiológicos da ET-1 nesse sistema.

Evidências funcionais demonstrando a participação das ETs no controle do fluxo biliar sugerem o envolvimento desses peptídeos nas patologias do trato biliar. Isales *et al.* (1993) constataram que a infusão de ET-1 induz colestase no fígado perfundido de rato por vasoconstrição hepática, com conseqüente aumento na pressão portal e decréscimo do fluxo biliar. No caso específico de coletíase, é possível que as ETs estejam envolvidas nas alterações de motilidade ou de secreção iônica da vesícula nesta condição. Como podemos verificar nesse estudo, as

contrações induzidas por ETs na vesícula biliar de cobaia ocorrem através de ativação de receptores específicos localizados na musculatura lisa.

A CCK-8, um importante mediador fisiológico da contração vesicular, estimula a síntese de ET-1 em células epiteliais cultivadas da vesícula biliar humana (Housset *et al.*, 1993). Além disso, a ET-1 parece participar na manutenção do fluxo biliar, aumentando a frequência de contração dos canalículos biliares de rato (Kamimura *et al.*, 1993), e na regulação da motilidade do colédoco (Kraus *et al.*, 1995). Assim, podemos sugerir que alterações na síntese ou nas ações da ET-1 no trato biliar podem estar relacionadas com a formação de cálculos na vesícula. A colecistite aguda induzida experimentalmente, por ligação do ducto biliar, está associada a um aumento da síntese de prostaciclina na vesícula biliar de coelho (Myers *et al.*, 1993). No presente trabalho evidenciamos que os prostanóides são importantes mediadores/moduladores das contrações induzidas por ET-1 na vesícula biliar de cobaia. Além disso, há um relato de que o glicocorticóide antiinflamatório dexametasona inibe a expressão de receptores ET<sub>B</sub> no cérebro de rato (Shibata *et al.*, 1995). Como a vesícula biliar, pelo menos de cobaia, também parece apresentar receptores ET<sub>B</sub>, estudos complementares seriam importantes para analisar uma possível relação entre a alteração na síntese de eicosanóides e os níveis e/ou ação da ET-1 na musculatura lisa da vesícula biliar durante uma colecistite.

As células de revestimento sinusoidais no fígado (Rieder *et al.*, 1991) e as células epiteliais do ducto biliar (Housset *et al.*, 1993) são fontes de ET no fígado. Pacientes com cirrose apresentam concentrações plasmáticas elevadas de ET-1 e ET-3 (Gerbes *et al.*, 1995; Moller *et al.*, 1995). Concentrações altas de big-ET e ET também foram detectadas em amostras de bile obtidas de pacientes recém-submetidos a transplante de fígado (Kraus *et al.*, 1995). Por outro lado, o pâncreas de rato apresenta RNAm (Bloch *et al.*, 1989) e receptores (Ihara *et al.*, 1992) para as ETs, e Kogire *et al.* (1995) sugerem que a pancreatite induzida por cerulina, um peptídeo relacionado à CCK-8, em rato está associada com redução dos sítios de ligação para ET-1 nos ácinos pancreáticos. A ET-1 também é encontrada em quantidade significativa em adenocarcinomas de cólon (Suzuki *et al.*, 1989; Kusuhara *et al.*, 1990) e de próstata humanos (Nelson *et al.*, 1995). Convém estabelecer se nos carcinomas do trato biliar a produção de ET-1 também está aumentada.

Concluindo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a ET-1 é um potente agente contrátil da vesícula biliar de cobaia, sendo que sua ação depende da síntese de eicosanóides e do influxo de  $Ca^{2+}$  (em parte através dos canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem do tipo L). Foi verificado ainda que, a exemplo da ET-1, a ET-2 e a ET-3 são equipotentes em contrair a vesícula biliar

de cobaia e que a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 também foram ativos. Além disso, o BQ-788, antagonista não-seletivo dos receptores  $ET_B$ , deslocou à direita, de modo dependente de concentração, a curva concentração-resposta à sarafotoxina S6c. Por sua vez, o RES-701-1, antagonista seletivo de receptores  $ET_{B1}$ , não alterou a contração produzida pela sarafotoxina S6c. Tais achados sugerem que parte da resposta contrátil das ETs na vesícula biliar de cobaia ocorre através da ativação de receptores do tipo  $ET_{B2}$ . As observações de que o bosentan, mas não o BQ-123, inibiu as contrações induzidas pela ET-1, e que o  $E_{máx}$  da sarafotoxina S6c foi menor do que o obtido para a ET-1, sugerem, ainda, a presença de uma população discreta, mas significativa, de receptores  $ET_{A2}$  no tecido. Finalmente, a vesícula biliar de cobaia apresentou atividade pronunciada de ECE sensível ao bloqueio pelo fosforamidom, que converte a big-ET-1 e big-ET-2, mas não a big-ET-3. Estudos complementares são necessários para caracterizar os papéis fisiológicos e/ou fisiopatológicos das ETs na vesícula biliar.

## 6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo procurou caracterizar os receptores e alguns dos mecanismos envolvidos nas contrações induzidas por endotelinas (ETs) na vesícula biliar isolada de cobaia (VBC), bem como determinar a presença de enzima conversora para ET (ECE) nessa preparação. As preparações foram montadas para registro de contrações isométricas em 5 ml de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, borbulhada com 5% de CO<sub>2</sub> em O<sub>2</sub>.

Os experimentos realizados com as ETs revelaram que:

1. A ET-1 (0,01-100 nM) causou uma contração tônica gradativa na VBC, apresentando CE<sub>50</sub> (média geométrica com limite de confiança para 95%) de 1,7 nM (0,6-5,3) e E<sub>máx</sub> (efeito contrátil máximo, expresso como porcentagem da resposta ao KCl 80 mM) de 129 ± 10% (média ± E. P. M.). As respostas induzidas pela ET-1 foram semelhantes às aquelas causadas pela colecistocinina sulfatada (26-33) (CCK-8) (0,01-100 nM) [CE<sub>50</sub> de 4,7 nM (1,5-7,5), E<sub>máx</sub> de 123 ± 7%]. Por outro lado, o carbacol e a histamina (ambos 3 nM a 300 µM) foram 290 e 1000 vezes menos potentes do que a ET-1 (ao nível da CE<sub>50</sub>), respectivamente, apesar de induzirem E<sub>máx</sub> maiores [carbacol: CE<sub>50</sub> 492 nM (318-764), E<sub>máx</sub> 197 ± 7%; histamina: CE<sub>50</sub> 1685 nM (568-4991), E<sub>máx</sub> 178 ± 5%].



2. O efeito contrátil da ET-1 foi parcialmente inibido pela nicardipina (1  $\mu\text{M}$ ), indometacina (5,6  $\mu\text{M}$ ) ou ibuprofeno (5  $\mu\text{M}$ ), e quase que abolido pela remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  do líquido nutriente.

3. A ET-2 [ $\text{CE}_{50}$  6,4 nM (2,5-15,8),  $E_{\text{máx}}$  137  $\pm$  4%], ET-3 [ $\text{CE}_{50}$  6,3 nM (3,7-10,7),  $E_{\text{máx}}$  130  $\pm$  8%] e o agonista seletivo de receptores  $\text{ET}_B$ , sarafotoxina S6c [ $\text{CE}_{50}$  1,5 nM (0,8-2,8),  $E_{\text{máx}}$  103  $\pm$  6%], todos nas concentrações de 0,01-100 nM, foram equipotentes a ET-1 em contrair a VBC. No entanto, o IRL 1620 [Suc-(Glu<sup>9</sup>, Ala<sup>11,15</sup>)-ET-1] (0,01-100 nM), outro agonista seletivo de receptores  $\text{ET}_B$ , foi menos ativo do que a ET-1. A  $\text{CE}_{50}$  do IRL 1620 não foi determinada porque a resposta máxima não foi alcançada até a concentração de 100 nM.

4. A incubação das preparações com o antagonista não-seletivo de receptores para ETs, o bosentan {4-tetra-butil-N-[6-(2-hidróxi-etóxi)-5-(2-metóxi-fenóxi)-2,2'-bipirimidina-4-il]-benzenosulfonamida} (1  $\mu\text{M}$ ) reduziu significativamente a reatividade da preparação à ET-1, à sarafotoxina S6c e, mais ainda, à ET-3.

5. O BQ-123 [ciclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu)] (300 nM), antagonista seletivo de receptores do tipo  $\text{ET}_A$ , não alterou as respostas à ET-1, ET-3 ou sarafotoxina S6c (0,1-100 nM).

6. Da mesma forma, o antagonista seletivo de receptores do tipo  $\text{ET}_B$ , o RES-701-1 [(Gly<sup>1</sup>-Asp<sup>9</sup>)(Gly-Asn-Trp-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Asp-Trp-Phe-Phe-

Asn-Tyr-Tyr-Trp) cíclico] (3  $\mu\text{M}$ ) também não afetou as respostas induzidas pela sarafotoxina S6c (0,1-100 nM).

7. Em contraste, o BQ-788 (N-cis-2,6-dimetil-piperidinocarbonil-L-gama-metileucil-D-1-metoxi-carboniltriptofanil-D-norleucina) (0,3 e 1  $\mu\text{M}$ ), outro antagonista seletivo de receptores do tipo  $\text{ET}_B$ , deslocou à direita, de modo dependente da concentração, as curvas concentração-resposta à sarafotoxina S6c e ET-3 (0,1-100 nM). No entanto, o BQ-788 não alterou a curva concentração-efeito à ET-1 (0,1-100 nM).

8. A big-ET-1 e a big-ET-2 (1-100 nM), precursores imediatos da ET-1 e da ET-2, foram equipotentes entre si em contrair a VBC [ $\text{CE}_{50}$  13,2 nM (7-24,6) e  $E_{\text{máx}}$  151  $\pm$  13%,  $\text{CE}_{50}$  20,1 nM (6,8-59,4) e  $E_{\text{máx}}$  145  $\pm$  9%, respectivamente). Quando comparadas ao seus metabólitos ativos, a big-ET-1 e a big-ET-2 foram de 3 a 10 vezes menos potentes, mas as respostas aos precursores foram consideravelmente mais lentas. Por outro lado, a big-ET-3 (1-100 nM), precursor da ET-3, mostrou-se inativa até a concentração de 100 nM.

9. A incubação da VBC com o fosforamidom (100  $\mu\text{M}$ ), inibidor de metaloproteases, reduziu as respostas contráteis à big-ET-1 e à big-ET-2, não alterou significativamente a reatividade da preparação à ET-1, mas aumentou discretamente as respostas a 100 nM de ET-2 ou ET-3.

10. Tais achados permitem concluir que a ET-1 é um potente agente contrátil da VBC, sendo que sua ação depende da síntese de eicosanóides e do influxo de  $Ca^{2+}$  (em parte através dos canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem do tipo L). Foi verificado ainda que, a exemplo da ET-1, a ET-2 e a ET-3 são equipotentes em contrair a VBC e que a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 também foram ativos. Além disso, o BQ-788, antagonista não-seletivo dos receptores  $ET_B$ , deslocou à direita, de modo dependente de concentração, a curva concentração-resposta à sarafotoxina S6c. Por sua vez, o RES-701-1, antagonista seletivo de receptores  $ET_{B1}$ , não alterou a contração produzida pela sarafotoxina S6c. Tais achados sugerem que parte da resposta contrátil das ETs na VBC ocorre através da ativação de receptores do tipo  $ET_{B2}$ . As observações de que o bosentan, mas não o BQ-123, inibiu as contrações induzidas pela ET-1, e que o  $E_{máx}$  da sarafotoxina S6c foi menor do que o obtido para a ET-1, sugerem, ainda, a presença de uma população discreta, mas significativa, de receptores  $ET_{A2}$  no tecido. Finalmente, a vesícula biliar de cobaia apresentou atividade pronunciada de ECE sensível ao bloqueio pelo fosforamidom, que converte a big-ET-1 e big-ET-2, mas não a big-ET-3. Estudos complementares são necessários para caracterizar os papéis fisiológicos e/ou fisiopatológicos das ETs na vesícula biliar.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

The current study attempted to assess the receptors and mechanisms involved in the contractile effects of endothelins (ETs) in strips of guinea pig isolated gall bladder (GPGB). The possible occurrence of ET-converting enzyme (ECE) activity in this tissue was also tested. Preparations were set up for recording of isometric contractions in 5 ml of warm oxygenated Krebs-Henseleit solution.

The experiments performed revealed that:

1. ET-1 (0.01-100 nM) caused slowly-developing sustained contractions of the GPGB, with an  $EC_{50}$  (geometric mean with 95% confidence intervals) of 1.7 nM (0.6-5.3) and an  $E_{max}$  (mean  $\pm$  S.E.M., expressed as % of the response to KCl 80 mM) of  $129 \pm 10\%$ . Responses to ET-1 were similar to those induced by sulfated cholecystinin (fragment 26-34) (CCK-8; 0.01-100 nM) [ $EC_{50}$  4.7 nM (1.5-7.5);  $E_{max}$   $123 \pm 7\%$ ], whereas carbachol and histamine were considerably less potent, but induced greater  $E_{max}$  [carbachol:  $EC_{50}$  492 nM (318-764),  $E_{max}$   $197 \pm 7\%$ ; histamine:  $EC_{50}$  1,685 nM (568-4991),  $E_{max}$   $178 \pm 5\%$ ].
2. ET-1-induced contractions were attenuated by incubation with nicardipine (1  $\mu$ M), indomethacin (5.6  $\mu$ M) or ibuprofen (5  $\mu$ M), and were almost abolished in GPGB bathed in calcium-free medium.

3. ET-2 [ $EC_{50}$  6.4 nM (2.5-15.8),  $E_{max}$   $137 \pm 4\%$ ], ET-3 [ $EC_{50}$  6.3 nM (3.7-10.7),  $E_{max}$   $130 \pm 8\%$ ] and the  $ET_B$  receptor-selective agonist sarafotoxin S6c [ $EC_{50}$  1.5 nM (0.8-2.8),  $E_{max}$   $103 \pm 3\%$ ], each between 0.01 and 100 nM, were all equipotent to ET-1 in contracting the GPGB. Another  $ET_B$  receptor-selective agonist, IRL 1620, was also active but less potent than the other agonists, such that the  $E_{max}$  was not clearly reached with up to 100 nM.
4. Contractions induced by ET-1, sarafotoxin S6c and, to a greater extent, those induced by ET-3 (all 0.1-100 nM) were significantly inhibited in presence of bosentan (1  $\mu$ M), a non-selective antagonist of  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors.
5. In contrast, the selective  $ET_A$  receptor antagonist BQ-123 (300 nM) failed to modify responses induced by ET-1, ET-3 or sarafotoxin S6c (0.1-100 nM).
6. The  $ET_B$  receptor-selective antagonist RES-701-1 (3  $\mu$ M) was inactive against sarafotoxin S6c-induced contractions of the GPGB.
7. However, another  $ET_B$  receptor-selective antagonist, BQ-788 (0.3 to 1  $\mu$ M), failed to modify ET-1-induced contractions, but caused concentration-dependent reduction of responses triggered by ET-3 and, to a greater extent, by sarafotoxin S6c.
8. Both big-ET-1 and big-ET-2 (1-100 nM) were equipotent in causing more slowly-developing contractions of the GPGB, and were only 3 to 10-fold less

potent than their respective immediate metabolites ET-1 and ET-2. Big-ET-3, however, was inactive up to 100 nM.

9. Incubation with the metalloprotease blocker phosphoramidon (100  $\mu$ M) significantly reduced contractions triggered by big-ET-1 and big-ET-2, did not affect ET-1-induced responses, and actually enhanced responses induced by 100 nM of either ET-2 or ET-3.

The results of the current study demonstrate that ET-1 is a potent contractile agonist in the GPGB. Its effects depend on synthesis of prostanoids and influx of extracellular calcium in part via L-type channels. The similar contractile potencies of the natural mammalian ETs, the activity of sarafotoxin S6c and IRL 1620, and the ability of BQ-788, but not RES-701-1, to inhibit responses to ET-3 and/or sarafotoxin S6c suggests the GPGB contains ET<sub>B2</sub> receptors. However, the fact that bosentan, but not BQ-123, can inhibit ET-1-induced contractions and that the E<sub>max</sub> of sarafotoxin S6c is smaller than that of ET-1 may indicate that this tissue also expresses a significant population of ET<sub>A2</sub> receptors. Finally, the GPGB also displays pronounced phosphoramidon-sensitive ECE activity, which can effectively process big-ET-1 and big-ET-2, but not big-ET-3. Further studies are needed to elucidate the possible physiological and pathophysiological roles of ETs in the gall bladder and other tissues of the biliary tract.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASSI, Z. A.; TATE, J. E.; GOLOMB, E.; KEISER, H. R. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension*, **20**: 89-95, 1992.
- AMBAR, I.; SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur. J. Pharmacol.*, **245**: 31-45, 1993.
- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**: 730-732, 1990.
- AUGUET, M.; DELAFLOTTE, S.; CHABRIER, P. E.; PIROTSKY, E.; CLOSTRE, F.; BRAQUET, P. Endothelin and Ca<sup>2+</sup> agonist BAY K 8644: different vasoconstrictive properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**: 186-192, 1988.
- BATTISTINI, B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SIROIS, P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.*, **68**: 600-628, 1993.
- BATTISTINI, B.; FILEP, J. G.; CRAGOE JR., E. J.; FOURNIER, A.; SIROIS, P. A role for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in contraction of guinea pig airways by endothelin-1 *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 583-588, 1991.
- BATTISTINI, B.; O'DONNELL, L. J. D.; WARNER, T.D.; FOURNIER, ALAIN.; FARTHING, M. J. G.; VANE, J. R. Characterization of endothelin (ET) receptors in the isolated gall bladder of the guinea-pig: evidence for an additional ET receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.*, **112**: 1244-1250, 1994.
- BATTISTINI, B.; WOODS, M.; O'DONNELL, L. J. D.; WARNER, T. D.; CORDER, R.; FOURNIER, A.; FARTHING, M. J. G.; VANE, J. R. Contractile activity of endothelin precursors in isolated gallbladder of the guinea-pig: presence of an endothelin-converting enzyme. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1383-1390, 1995.
- BAX, W. A.; BOS, E.; SAXENA, P. R. Heterogeneity of endothelin/sarafotoxin receptors mediating contractions of the human isolated saphenous vein. *Eur. J. Pharmacol.*, **239**: 267-268, 1993.

- BAX, W. A.; SAXENA, P. R. The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 379-386, 1994.
- BAYNASH, A. G.; HOSODA, K.; GIAID, A.; RICHARDSON, J. A.; EMOTO, N.; HAMMER, R. E.; YANAGISAWA, M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, **79**: 1277-1285, 1994.
- BEINBORN, M.; LEE, Y.-M.; MCBRIDE, E. W.; QUINN, S. M.; KOPIN, A. S. Distinct between gastrin and CCK-8 receptor domains. *Nature*, **362**: 348-350, 1993.
- BERTELSEN, G. A.; REBELLO, S.; GULATI, A. Characteristics of endothelin receptors in the cerebral cortex and spinal cord of aged rats. *Neurobiol. Aging*, **13**: 513-519, 1992.
- BILLAH, M. M.; ANTHES, J. C.; MULLMANN, T. J. Receptor-coupled phospholipase D: regulation and functional significance. *Biochem. Soc. Trans.* **19**: 324-329, 1991.
- BLACK, P. N.; GHATEI, M. A.; TAKAHASHI, D.; BRETHERTON-WATT, D., KRANSZ, T.; DOLLERY, C. T.; BLOMM, S. R. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett.*, **225**: 129-132, 1989.
- BLOCH, D. K.; HONG, C. C.; EDY, R. L.; SHOWS, T. W.; QUERTERMOUS, T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene-vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. *Genomics*, **10**: 236-242, 1991.
- BLOCH, K. D.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; QUETERMOUS, T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J. Biol. Chem.*, **264**: 18156-18161, 1989.
- BROWN, M. A.; SMITH, P. L. Endothelin: a potent stimulator of intestinal ion secretion *in vitro*. *Regul. Pept.*, **36**: 1-19, 1991.
- CABRINI, D. A.; SILVA, A. M.; CALIXTO, J. B. Mechanisms of bradykinin-induced contraction of the guinea-pig gallbladder *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1549-1556, 1995.



- CAIRNS, H. S.; ROGERSON, M. E.; FAIRBANKS, L. D.; NIELD, G. H.; WESTWICK, J. Endothelin induces an increase in renal vascular resistance and fall in glomerular filtration rate in the rabbit isolated perfused kidney. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 155-160, 1989.
- CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. Effects of endothelins, Bay K 8644 and other oxytocics in non-pregnant and late pregnant rat isolated uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, **192**: 109-116, 1991.
- CASEY, M. L.; BYRD, W.; MACDONALD, P. C. Massive amounts of immunoreactive endothelin in human seminal fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **74**: 223-224, 1992.
- CHAN, J.; GREENBURG, D. A. SK;F 96365, a receptor-mediated calcium entry inhibitor, inhibits calcium responses to endothelin-1 in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**: 1141-1146, 1991.
- CHIOU, W. J.; SHIOSAKI, K.; TASKER, A. S.; WU-WONG, J. R. Characterization of two endothelin converting enzymes and their preference for big endothelin-1 and -2 as substrates. *Life Sci.*, **54**: 1613-1619, 1994.
- CLOZEL, M.; BREU, V.; GRAY, G. A.; KALINA, B.; LÖFFLER, B.-M.; BURRI, K.; CASSAL, J.-M.; HIRTH, G.; MÜLLER, M.; NEIDHART, W.; RAMUZ, H. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active non-peptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**: 228-235, 1994.
- COZZA, E. N.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; FOECKING, M. F.; CHIOU, S. Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.*, **84**: 1032-1035, 1989.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; CLAING, A.; TÉLÉMAQUE, S.; MAURICE, M.-C.; YANO, M.; GRATTON, J.-P. Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A<sub>2</sub> from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ET<sub>B</sub> receptor antagonist, BQ-788. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1257-1262, 1994.

- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. Endothelin-1 contracts blood vessels independently of the dihydropyridine sensitive calcium channel activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **165**: 289-293, 1989.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M.; YANO, M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET<sub>A</sub> receptors in the rat perfused lung. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 773-775, 1992.
- DAVENPORT, A. P.; MAGUIRE, J. J. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET<sub>A</sub> receptor in humans? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 9-11, 1994.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 9797-9800, 1988.
- DENAULT, J.-B.; CLAING, A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SAWAMURA, T.; KIDO, T.; MASAKI, T.; LEDUC, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.*, **362**: 276-280, 1995.
- DONOSO, M. V.; SALAS, C.; SEPULVEDA, G.; LEWIN, J.; FOURNIER, A.; HUIDOBRO-TORO, J. P. Involvement of ETA receptors in the facilitation by endothelin-1 of non-adrenergic/non-cholinergic transmission in the rat urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.*, **111**: 473-482, 1994.
- DOUGLAS, S. A.; BECK JR., G. R.; ELLIOTT, J. D.; OHLSTEIN, E. H. Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1529-1540, 1995.
- EGLIN, R. M.; MICHEL, A. D.; SHARIF, N. A.; SWANK, S. R.; WHITING, R. L. The pharmacological properties of the peptide endothelin. *Br. J. Pharmacol.*, **97**: 1297-1307, 1989.
- EGLEZOS, A.; CUCCHI, P.; PATACCHINI, R.; QUARTARA, L.; MAGGI, C.A.; MIZRAHI, J. Differential effects of BQ-123 against endothelin-1 and endothelin-3 on rat vas deferens: evidence for an atypical endothelin receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 736-738, 1993.

- EMORI, T.; HIRATA, Y.; MARUMO, F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett.*, **263**: 261-264, 1990.
- EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.*, **270**: 15262-15268, 1995.
- FILEP, J. G.; BATTISTINI, B.; SIROIS, P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1633-1640, 1991b.
- FILEP, J. G.; SIROIS, M. E.; ROUSSEAU, A.; FOURNIER, A.; SIROIS, P. Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet-activating factor. *Br. J. Pharmacol.*, **104**: 797-804, 1991a.
- FLEMING, W. W.; WESTFALL, D. P.; DE LA LANDE, I. S.; JELLETT, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **181**: 339-345, 1972.
- FOLTA, A.; JOSHUA, I. G.; WEBB, R. C. Dilator actions of endothelin in coronary resistance vessels and the abdominal aorta of the guinea pig. *Life Sci.*, **45**: 2627-2635, 1989.
- FONG, T. M.; CASCIERE, M. A.; YU, H.; BANSAL, A.; SWAIN, C.; STRADER, C.D. Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345. *Nature*, **362**: 350-356, 1993.
- FUKADA, Y.; HIRATA, Y.; YOSHIMI, H.; TAKATSUGA, K.; KOBAYASHI, Y.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**: 167-171, 1988.
- FUKUDA, N.; SOMA, M.; IZUMI, Y.; MINATO, M.; WATANABE, Y.; WATANABE, M.; HATANO, M. Low doses of endothelin-3 elicit endothelium dependent vasodilatation which accompanies with elevation of cyclic GMP. *Japanese Circ. J.*, **55**: 617-621, 1991.

- FUKURODA, T.; NOGUCHI, K.; TSUCHIDA, S.; NISHIKIBE, M.; IKEMOTO, F.; OKADA, K.; YANO, M. Inhibition of biological actions of big-endothelin-1 by phosphoramidon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**: 390-395, 1990.
- FUKURODA, T.; OZAKI, S.; IHARA, M.; ISHIKAWA, K.; YANO, M.; NISHIKIBE, M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 336-338, 1994.
- FULGINITTI, J.; COHEN, M. M.; MORELAND, R. S. Endothelin differentially affects rat gastric longitudinal and circular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **265**: 1413-1420, 1993.
- FUXE, K.; ANDBJER, B.; KALIA, M.; AGNATI, L. F. Centrally administered endothelin-1 produces apnoea in the  $\alpha$ -chloralose-anesthetized male rat. *Acta Physiol. Scand.*, **137**: 157-158, 1989.
- GARCIA-PASCUAL, A.; LARSSON, B.; ANDERSSON, K. E. Contractile effects of endothelin-1 and localization of endothelin binding sites in rabbit lower urinary tract smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **140**: 545-555, 1990.
- GARCIA-PASCUAL, A.; PERSSON, K.; HOLMQUIST, F.; ANDERSSON, K. E. Endothelin-1 induced phosphoinositide hydrolysis and contraction in isolated rabbit detrusor and urethral smooth muscle. *Gen. Pharmacol.*, **24**: 131-138, 1993.
- GERBES, A. L.; MOLLER, S.; GÜLBERG, V.; HENRIKSEN, J. H. Endothelin-1 and -3 plasma concentrations in patients with cirrhosis: role of splanchnic and renal passage and liver function. *Hepatology*, **21**: 735-739, 1995.
- GETHER, U.; JOHANSEN, T. E.; SCHWARTZ, T. W.; Chimeric NK<sub>1</sub> (substance P)/NK<sub>3</sub>(neurokinin B) receptors: identification of domains determining the binding specificity of tachykinin agonists. *J. Biol. Chem.*, **268**: 7893-7898, 1993a.
- GETHER, U.; JOHANSEN, T. E.; SNIDER, R. M.; LOWE III, J. A.; NAKANISHI, S.; SCHWARTZ, T. W. Different binding epitopes on the NK<sub>1</sub> receptor for substance P and a non-peptide antagonist. *Nature*, **362**: 345-349, 1993b.

- GOETZ, K. L.; WANG, B. C.; MADWED, J. B.; ZHU, J. L.; LEADLEY JR., R. J. Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, **255**: R1064-R1068, 1988.
- GRASSI-KASSISSE, D. M.; FARO, R.; WITHRINGTON, P. G.; ZATZ, R.; OPGENORTH, T. J.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Characterisation of functional endothelin receptors in the canine isolated perfused spleen. *Eur. J. Pharmacol.*, **282**: 57-63, 1994.
- GRATTON, J.-P.; RAE, G. A.; CLAING, A.; TÉLÉMAQUE, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Different pressor and bronchoconstrictor properties of human big-endothelin-1, 2 (1-38) and 3 in ketamine/xylazine-anaesthetized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 000-007, 1995.
- GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Regional and cellular heterogeneity of cholecystikinin receptors mediating muscle contraction in the gut. *Gastroenterology*, **92**: 175-180, 1987.
- GUIMARÃES, C. L.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. Potent constrictor actions of endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3 in rat isolated portal vein. *Hypertension*, **19**: 79-86, 1992.
- GUIMARÃES, C. L.; RAE, G. A. Dual effects of endothelins -1, -2 and -3 on guinea pig field-stimulated ileum: possible mediation by two receptors coupled to pertussis toxin-insensitive mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**: 1253-1259, 1992.
- GULATI, A.; REBELLO, S. Down-regulation of endothelin receptors in the ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, **48**: 1207-1215, 1991.
- GULATI, A.; SRIMAL, R. C. Endothelin mechanisms in the central nervous system: a target for drug development. *Drug Develop. Res.*, **26**: 361-387, 1992.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190, 1992.
- HAY, D. W. P.; HENRY, P. J.; GOLDIE, R. G. Endothelin and the respiratory system. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **14**: 29-32, 1993.

- HIRATA, Y.; KANNO, K.; WATANABE, T.; KUMAGAYE, S.-I.; NAKAJIMA, K.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S.; MARUMO, F. Receptor binding and vasoconstrictor activity of big-endothelin. *Eur. J. Pharmacol.*, **176**: 225-228, 1990.
- HOLMQUIST, F.; ANDERSSON, K-E.; HEDLUND, H. Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol. Scand.*, **139**: 113-122, 1990.
- HOSODA, K.; HAMMER, R. E.; RICHARDSON, J. A.; BAYNASH, A. G.; CHEUNG, J. C.; GIAID, A.; YANAGISAWA, M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, **79**: 1267-1276, 1994.
- HOUSSET, C.; CARAYON, A.; HOUSSET, B.; LEGENDRE, C.; HANNOUN, L.; POUPON, R. Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. *Lab. Invest.*, **69**: 750-755, 1993.
- HU, J. R.; BERNINGER, U. G.; LANG, R. E. Endothelin stimulates atrial natriuretic peptide (ANP) release from rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 177-180, 1988b.
- HU, J. R.; HARSDORF, R. V.; LANG, R. E. Endothelin has potent inotropic effects in rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 275-278, 1988a.
- HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.*, **26**: 223-242, 1992.
- IGNARRO, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.*, **65**: 1-21, 1989.
- IHARA, M.; NOGUCHI, K.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; TSUCHIDA, S.; KIMURA, S.; FUKAMI, T.; ISHIKAWA, K.; NISHIKIBE, M.; YANO, M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET<sub>A</sub> receptor. *Life Sci.*, **50**: 247-255, 1992.
- IHARA, M.; SAEKI, T.; KIMURA, S.; YANO, M. Endothelin receptor subtypes in porcine tissues. *Jap. J. Pharmacol.*, **52**: 203P, 1990.

- INAGAKI, H.; BISHOP, A. E.; ESCRIG, C.; WHARTON, J.; ALLEN-MERSH, T. G.; POLAK, J. M. Localization of endothelin-like immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterology*, **101**: 47-54, 1991b.
- INAGAKI, H.; BISHOP, A. E.; YURA, J. Localization of endothelin-1 and its binding sites to the nervous system of the human colon. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**: S455-S457, 1991a.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 2863-2867, 1989.
- ISALES, C. M.; NATHANSON, M. H.; BRUCK, R. Endothelin-1 induces cholestasis which is mediated by an increase in portal pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 1244-1251, 1993.
- ISHIKAWA, K.; IHARA, M.; NOGUCHI, K.; MASE, T.; MINO, N.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; FUKAMI, T.; OZAKI, S.; NAGASE, T.; NISHIKIBE, M.; YANO, M. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 4892-4896, 1994.
- IWAI, M.; HORI, S.; SHIGEMOTO, R.; KANZAKI, H.; MORI, T.; NAKANISHI, S. Localization of endothelin receptor messenger ribonucleic acid in the rat ovary and fallopian tube by *in situ* hybridization. *Biol. Reprod.*, **49**: 675-680, 1993.
- KAMIMURA, Y.; SAWADA, N.; AOKI, M.; MORI, M. Endothelin-1 induces contraction of bile canaliculi in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 817-822, 1993.
- KANYICKSKA, B.; BURRIS, T. P.; FREEMAN, M. E. Endothelin-3 inhibits prolactin and stimulates LH, FSH and TSH secretion from pituitary cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**: 338-343, 1991.
- KARAKI, H.; SUDJARWO, S. A.; HORI, M.; TAKAI, M.; URADE, Y.; OKADA, T. Induction of endothelium-dependent relaxation in the aorta by IRL 1620, a novel and selective agonist at endothelin ET<sub>B</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 486-490, 1993.

- KARAKI, H.; SUDJARWO, S. A.; HORI, M.; TANAKA, T.; MATSUDA, Y. Endothelin ET<sub>B</sub> receptor antagonist, RES-701-1: effects on isolated blood vessels and small intestine. *Eur. J. Pharmacol.*, **262**: 255-259, 1994.
- KARNE, S.; JAYAWICKREME, C. K.; LERNER, M. R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.*, **268**: 19126-19133, 1993.
- KASHIWABARA, T.; INAGAKI, Y.; OHTA, H.; IWAMATSU, A.; NOMIZU, M.; MORITA, A.; NISHIKORI, K. Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity *in vitro* but a potent pressor effect *in vivo*. *FEBS Lett.*, **247**: 73-76, 1989.
- KATOH, T.; CHANG, H.; UCHIDA, S.; OKUDA, T.; KUROKAWA, K. Direct effects of endothelin in the rat kidney. *Am. J. Physiol.*, **258**: F397-F402, 1990.
- KITAJIMA, T.; YAMAGUCHI, T.; TANI, K.; KUBOTA, Y.; OKUHIRA, M.; INOUE, K.; YAMADA, H. Role of endothelin and platelet-activating factor in indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. *Digestion*, **54**: 156-159, 1993.
- KOBAYASHI, S.; TANG, R.; WANG, B.; OPGENORTH, T.; STEIN, E.; SHAPIRO, E.; LEPOR, H. Localization of endothelin receptors in the human prostate. *J. Urol.*, **151**: 763-766, 1994.
- KOCHVA, E.; BDOLAH, A.; WOLLBERG, Z. Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function. *Toxicol.*, **31**: 541-568, 1993.
- KOGIRE, M.; INOUE, K.; HIGASHIDE, S.-I.; TAKAORI, K.; ECHIGO, Y.; GU, Y.-J.; SUMI, S.; UCHIDA, K.; IMAMURA, M. Protective effects of endothelin-1 on acute pancreatitis in rats. *Digest. Dis. and Sci.*, **40**: 1207-1212, 1995.
- KOSUKA, M.; ITO, T.; HIROSE, S.; TAKAHASHI, K.; HAGIWARA, H. Endothelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage-dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**: 317-323, 1989.



- KRAUS, T.; KLAR, E.; MEHRABI, A.; BLEYL, J.; AULMANN, M.; OSSWALD, B. R.; HERFARTH, C.; OTTO G. Endothelin 1/2 and big-endothelin concentration in bile samples during the early postoperative period after liver transplantation. *Transp. Proc.*, **27**: 1258-1260, 1995.
- KUKKOLA, P. J.; SAVAGE, P.; SAKANE, Y.; BERRY, J. C.; BILCI, N. A.; GHAI, R. D.; JENG, A. Y. Differential structure-activity relationships of phosphoramidon analogues for inhibition of three metalloproteases: endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase, and angiotensin-converting enzyme. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **26**: S65-S68, 1995.
- KURIHARA, Y.; KURIHARA, H.; SUZUKI, H.; KODAMA, T.; MAEMURA, K.; NAGAI, R.; ODA, H.; KUWAKI, T.; CAO, W.-H.; KAMADA, N.; JISHAGE, K.; OUCHI, Y.; AZUMA, S.; TOYODA, Y.; ISHIKAWA, T.; KUMADA, M.; YAZAKI, Y. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, **368**: 703-710, 1994.
- KUSUHARA, M.; YAMAGUCHI, K.; NAGASAKI, Y.; HAYASHI, C.; SUZAKI, A.; HORI, S.; HANDA, S.; NAKAMURA, Y.; ABE, K. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, **50**: 3257-3261, 1990.
- LANGENSTRÖER, P.; TANG, R.; SHAPIRO, E.; DIVISH, B.; OPGENORTH, T.; LEPOR, H. Endothelin-1 in the human prostate - tissue levels, source of production and isometric tension studies. *J. Urol.*, **150**: 495-499, 1993.
- LAZARATOS, S.; KASHIMURA, H.; NAKAHARA, A.; FUKUTOMI, H.; OSUGA, T.; URUSHIDANI, T.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K. Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1. Role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am. J. Physiol.*, **265**: G491-G498, 1993.
- LECCI, A.; GIULIANI, S.; SANTICIOLI, P.; ROVERO, P.; MAGGI, C. A.; GIACHETTI, A. Intracerebroventricular administration of endothelins: effects on the supraspinal micturition reflex and blood pressure in the anesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **199**: 201-207, 1991.
- LEE, J. A.; ELLIOTT, J. D.; SUTIPHONG, J. A.; FRIESEN, W. J.; OHLSTEIN, E. H.; STADEL, J. M.; GLEASON, J. G.; PEISHOFF, C. E. Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 7164-7168, 1994.

- LEMBECK, F.; DECRINIS, M.; PERTL, C.; AMANN, R.; DONNERER, J. Effects of endothelin on the cardiovascular system and on smooth muscle preparations in different species. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **340**: 744-751, 1989.
- MAAS, J.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; YANO, M.; RAE, G. A. Evidence for atypical endothelin receptors and for presence of endothelin-converting enzyme activity in the mouse isolated vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **276**: 113-121, 1995.
- MAGGI, C. A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, R.; BARBANTI, G.; TURINI, D.; MELI, A. Contractile responses of the human urinary bladder, renal pelvis and renal artery to endothelins and sarafotoxin S6b. *Gen. Pharmacol.*, **21**: 247-249, 1990.
- MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; GIULIANI, S.; MELI, A. Potent contractile effect of endothelin in isolated guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, **160**: 179-182, 1989.
- MASAKI, T.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med. Res. Rev.*, **12**: 391-421, 1992.
- MASUDA, E.; KAWANO, S.; NAGANO, K. Role of endogenous endothelin in pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Am. J. Physiol.*, **265**: G474-G481, 1993.
- MATSUMOTO, H.; SUZUKI, N.; ONDA, H.; FUJINO, M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 74-80, 1989.
- MATSUMURA, K.; ABE, I.; TSUCHIHASHI, T.; TOMINAGA, M.; KOBAYASHI, K.; FUJISHIMA, M. Central effects of endothelin on neurohormonal responses in conscious rabbits. *Hypertension*, **17**: 1192-1196, 1991.
- MATTERA, G. G.; EGLEZOS, A.; RENZETTI, A. R.; MIZRAHI, J. Comparison of the cardiovascular and neural activity of endothelin-1, -2, -3, and respective proendothelins: effects of phosphoramidon and thiorfan. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 331-337, 1993.

- MATTOLI, S.; MEZZETTI, M.; RIVA, G.; ALLEGRA, L.; FASOLI, A. Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **3**: 145-151, 1990.
- MILLER, V. M.; KOMORI, K.; BURNETT JR., J.C.; VANHOUTTE, P. M. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am. J. Physiol.*, **257**: H1127-H1131, 1989.
- MIURA, S.; KUROSE, I.; FUKUMURA, D.; SUEMATSU, M.; SEKIZUKA, E.; TASHIRO, H.; SERIZAWA, H.; ASAKO, H.; TSUCHIYA, M. Ischemic bowel necrosis induced by endothelin-1: an experimental model in rats. *Digestion*, **48**: 163-172, 1991.
- MOLLER, S.; GULBERG, V.; HENRIKSEN, J. H.; GERBES, A. L. Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *J. Hepatol.*, **23**: 135-144, 1995.
- MOUMMI, C.; GULLIKSON, G.W.; GAGINELLA, T. S. Effect of endothelin-1 on guinea pig gallbladder smooth muscle *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**: 549-553, 1992b.
- MOUMMI, C.; XIE, Y.; KACHUR, J. F.; GAGINELLA, T. S. Endothelin-1 stimulates contraction and ion transport in the rat colon: different mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**: 409-414, 1992a.
- MURCH, S. H.; BRAEGGER, C. P.; SESSA, W. C.; MACDONALD, T. T. High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet*, **339**: 381-385, 1992.
- MYERS, S.; BARTULA, L.; KALLEY-TAYLOR, B. The role of prostaglandin I<sub>2</sub> and biliary lipids during evolving cholecystitis in the rabbit. *Gastroenterology*, **104**: 248-255, 1993.
- NELSON, J. B.; HEDICAN, S. P.; GEORGE, D. J.; REDDI, A. H.; PIANTADOSI, S.; EISENBERGER, M. A.; SIMONS, J. W. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nature*, **1**: 944-949, 1995.

- NINOMIYA, H.; UCHIDA, Y.; ISHII, Y.; NOMURA, A.; KAMEYAMA, M.; SAOTOME, M.; ENDO, T.; HASEGAWA, S. Endotoxin stimulates release from cultured epithelial cells of guinea pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **203**: 299-302, 1991.
- NISHIMURA, T.; AKASU, T.; KRIER, J. Endothelin modulates calcium channel current in neurons of rabbit pelvic parasympathetic ganglia. *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1242-1250, 1991.
- OPGENORTH, T. J.; KIMURA, S.; WU-WONG, J. R. Characterization of endothelin-converting enzymes. *Meth. in Neurosci.* **23**: 251-265, 1995.
- PAYNE, A. N.; WHITTLE, B. J. R. Potent cyclo-oxygenase-mediated bronchoconstrictor effect of endothelin in the guinea-pig *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 303-305, 1988.
- PERSSON, K.; GARCIA-PASCUAL, A.; HOLMQUIST, F.; ANDERSSON, K. E. Endothelin-1-induced contractions of isolated pig detrusor and vesical arterial smooth muscle: calcium dependence and phosphoinositide hydrolysis. *Gen. Pharmacol.*, **23**: 445-453, 1992.
- PESKAR, B. M.; NOWAK, P.; LAMBRECHT, N. Effect of prostaglandins and capsaicin on gastric vascular flow and mucosal injury in endothelin-1 treated rats. *Agents Actions*, **37**: 85-91, 1992.
- RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; D'ORLÉANS, P. Big-endothelin-1 contracts rat isolated uterus via a phosphoramidon-sensitive endothelin ET<sub>A</sub> receptor-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, **240**: 113-119, 1993.
- RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. *Regul. Pept.*, **55**: 1-46, 1995.
- RAE, G. A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**: S89-S92, 1989.
- RAKOVSKA, A.; MILENOV, K.; YANEV, S. Mode of action of cholecystokinin octapeptide on smooth muscles of stomach, ileum and gallbladder. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, **8**: 697-703, 1986.

- RENNICK, R. E.; LOESCH, A.; BURNSTOCK, G. Endothelin, vasopressin and substance P like immunoreactivity in cultured and intact epithelium from rabbit trachea. *Thorax*, **47**: 1044-1049, 1992.
- RESINK, T. J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F. R. Endothelin stimulates phospholipase C in culture of vascular muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**: 1360-1368, 1988.
- REYNOLDS, E.; MOK, L.; KUROSAWA, S. Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 868-873, 1989.
- RIEDER, H.; RAMADORI, G.; MEYER, K. H. Sinusoidal endothelial liver cells *in vitro* release endothelin: augmentation by transforming growth factor  $\beta$  and Kupffer cell-conditioned media. *Klin. Wochenschr.*, **69**: 387-391, 1991.
- RIEZEBOS, J.; WATTS, I. S.; VALLANCE, P. J. Endothelin receptors mediating functional responses in human small arteries and veins. *Br. J. Pharmacol.*, **111**: 609-615, 1994.
- RODEN, M.; PLASS, H.; VIERHAPPER, H. Endothelin-1 stimulates chloride and potassium secretion in rabbit descending colon. *Eur. J. Pharmacol.*, **421**: 163-167, 1992.
- ROZENGURT, N.; SPRINGALL, D. R.; POLAK, J. M. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J. Pathol.*, **160**: 5-8, 1990.
- SAEKI, Y.; HIGUCHI, K.; NAKAMURA, S.; ARAKAWA, T.; NAGURA, H.; KOBAYASHI, K. Location of endothelin detected immunohistochemically in gastric mucosa. *Abstracts of the Third International Conference on Endothelin*, Houston, 109P, 1993.
- SAIDA, K.; MITSUI, Y.; ISHIDA, P. A novel peptide vasoactive intestinal contractor of new endothelin peptide family. *J. Biol. Chem.*, **264**: 1413-1416, 1989.

- SAKAMOTO, A.; YANAGISAWA, M.; SAWAMURA, T.; ENOKI, T.; OHTANI, T.; SAKURAI, T.; NAKAO, K.; TOYO-OKA, T.; MASAKI, T. Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin<sub>A</sub>-selective antagonist and endothelin<sub>B</sub>-selective agonists. *J. Biol. Chem.*, **268**: 8547-8553, 1993.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; TAUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K. Molecular characterization of endothelin receptors. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **13**: 103-108, 1992.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**: 732-735, 1990.
- SALOM, J. B.; TORREGROSA, G.; BARBERA, M. D.; JOVER, T.; ALBORCH, E. Endothelin receptors mediating contraction in goat cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 826-830, 1993.
- SAMSON, W. K.; SKALA, K. D.; HUANG, F. L. S.; GLUNTZ, S.; ALEXANDER, B. D.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Central nervous system action of endothelin-3 to inhibit water drinking in the rat. *Brain Res.*, **539**: 347-351, 1991.
- SCHILD, H. O. pA<sub>x</sub> and competitive drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.*, **4**: 277-280, 1949.
- SCHJOLDAGER, B. T.-B. G. The cholecystikinin receptor on the gallbladder. *Dan Med Bull*, **40**: 601-612, 1993.
- SHIBATA, K.; KOMATSU, C.; MISUMI, Y.; FURUKAWA, T. Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin B receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.*, **692**: 71-78, 1995.
- SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M.; TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18275-18278, 1994.
- SHIMADA, T. Voltage-dependent calcium channel current in isolated gallbladder smooth muscle cells of guinea pig. *Am. J. Physiol.*, **264**: G1066-G1076, 1993.

- SHUBEITA, H. E.; MCDONOUGH, P. M.; HARRIS, A. N.; KNOWLTON, K. U.; GLEMBOTSKI, C. C.; BROWN, J. H.; CHIEN, K. R. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, **265**: 20555-20562, 1990.
- SIMONSON, M. S. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.*, **73**: 375-411, 1993.
- SIMONSON, M. S.; OSANAI, T.; DUNN, M. J. Endothelin isopeptides evoke  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and oscillations of cytosolic free  $[\text{Ca}^{2+}]$  in human mesangial cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **1055**: 63-68, 1990.
- SIMONSON, M. S.; WANN, S.; MENÉ, P.; DUBYAK, G. R.; KESTER, M.; NAKAZATO, Y.; SEDOR, J. R.; DUNN, M. J. Endothelin stimulates phospholipase C,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **83**: 708-712, 1989.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical methods.*, Ames, Iowa State University Press, 1967.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmac. Ther.*, **54**: 129-149, 1992.
- SUDJARWO, S. A.; HORI, M.; TAKAI, M.; URADE, Y.; OKADA, T.; KARAKI, H. A novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci.*, **53**: 431-437, 1993.
- SUDJARWO, S. A.; MASATOSHI, H.; TANAKA, T.; MATSUDA, Y.; OKADA, T.; KARAKI, H. Subtypes of endothelin  $\text{ET}_A$  and  $\text{ET}_B$  receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**: 627-633, 1994.
- SUMNER, M. J.; CANNON, T. R.; MUNDIN, J. W., WHITE, D. G.; WATTS, I. S. Endothelin  $\text{ET}_A$  and  $\text{ET}_B$  receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 858-860, 1992.

- SUNAKO, M.; KAWAHARA, Y.; HIRATA, K.; TSUDA, T.; YOKOYAMA, M.; FUKUZAKI, H.; TAKAY, Y. Mass analysis of 1,2-diacylglycerol in cultured rabbit vascular smooth muscle cells - comparison of stimulation by angiotensin-II and endothelin. *Hypertension*, **15**: 84-88, 1990.
- SUZUKI, N.; MATSUMOTO, H.; KITADA, C.; KIMURA, S.; FUJINO, M. Production of endothelin-1 and big-endothelin-1 by tumor cells with epithelial-like morphology. *J. Biochem.*, **106**: 736-741, 1989.
- TAKAHASHI, K.; JONES, P.M.; KANSE, S. M.; LAM, H.-C.; SPOKES, R. A.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Endothelin in gastrointestinal tract. Presence of endothelin like immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology*, **99**: 1660-1667, 1990.
- TAKAHASHI, T.; MAY, D.; OWYANG, C. Cholinergic dependence of gallbladder response to cholecystokinin in the guinea pig *in vivo*. *Am. J. Physiol.*, **261**: G565-G569, 1991.
- TAKAI, M.; UMEMURA, I.; YAMASAKI, K.; WATAKABE, T.; FUJITANI, Y.; ODA, K.; URADE, Y.; INUI, T.; YAMAMURA, T.; OKADA, T. A potent and specific agonist, Suc-[Glu<sup>9</sup>, Ala<sup>11,15</sup>]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET<sub>B</sub> receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 953-959, 1992.
- TAKESHITA, H.; NISHIKIBE, M.; YANO, M.; IKEMOTO, F. Coronary vascular response to endothelin in isolated perfused hearts of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, **18**: 661-669, 1991.
- TAKUWA, N.; TAKUWA, Y.; YANAGISAWA, M.; YAMASHITA, K.; MASAKI, T. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **264**: 7856-7861, 1989.
- TANAKA, T.; TSUKUDA, E.; NOSAWA, M.; NONAKA, H.; OHNO, T.; KASE, H.; YAMADA, K.; MATSUDA, Y. RES-701-1: a novel, potent endothelin type B receptor-selective antagonist of microbial origin. *Molec. Pharmacol.*, **45**: 724-730, 1994.
- USUNE, S.; KATSURAGI, T.; FURUKUWA, T. Involvement of K<sup>+</sup> channel opening in endothelin-1 induced suppression of spontaneous contractions in the guinea pig taenia coli. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**: 1908-1913, 1991.



- VAN RENTERGHEM, C.; VIGNE, P.; BARHANIN, J.; SCHMID-ALLIANA, A.; FRELIN, C.; LAZDUNSKI, M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**: 977-985, 1988.
- VIGNE, P.; LADOUX, A.; FRELIN, C. Endothelins activate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in brain capillary endothelial cells via a high affinity endothelin-3 receptor that is not coupled to phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **226**: 5925-5928, 1991.
- VIGNE, P.; LAZDUNSKI, M.; FRELIN, C. The inotropic effect of endothelin-1 on rat atria involves hydrolysis of phosphatidylinositol. *FEBS Lett.*, **249**: 143-146, 1989.
- WALLACE, J. L.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G.; MCKNIGHT, G. W.; MACNAUGHTON, W. K. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am. J. Physiol.*, **256**: G661-G666, 1989.
- WARNER, T. D.; ALLCOCK, G. H.; CORDER, R.; VANE, J. R. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 777-782, 1993.
- WIKLUND, N. P.; ÖHLÉN, A.; WIKLUND, C. U.; CEDERQVIST, B.; HEDQVIST, P.; GUSTAFSSON, L. E. Neuromuscular actions of endothelin on smooth, cardiac and skeletal muscle from guinea pig, rat and rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, **137**: 399-407, 1989.
- WILLIAMS JR., D. L.; JONES, K. L.; PETTIBONE, D. J.; LIS, E. V.; CLINESCHMIDT, B. V. Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 556-561, 1991.
- WILLIAMS, D. L.; JONES, K. L.; ALVES, K.; CHAN, C. P.; HOLLIS, G. F.; TUNG, J. S. Characterization of cloned human endothelin receptors. *Life Sci.*, **53**: 407-414, 1993.
- WORD, R. A.; KAMM, K. E.; STULL, J. T.; CASEY, M. L. Endothelin increases cytoplasmic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **162**: 1103-1108, 1990.

- XU, D.; EMOTO, N.; GIAID, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DEWIT, D.; YANAGISAWA, M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell*, **78**: 473-485, 1994.
- YAMAMOTO, S.; MORIMOTO, I.; YAMASHITA, H.; ETO, S. Inhibitory effects of endothelin-3 on vasopressin release from rat supraoptic nucleus *in vitro*. *Neurosci. Lett.*, **141**: 147-150, 1992.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415, 1988.
- YANG, M. C.; TU, M. S.; CHOU, C. K.; HONG, C. Y.; KUO, J. S. cAMP and vascular action of endothelin. *Pharmacology*, **42**: 252-256, 1991.
- YAU, W. M.; YOUTHER, M. L. Modulation of gallbladder motility by intrinsic cholinergic neurons. *Am. J. Physiol.*, **247**: G662-G666, 1984.
- YONEYAMA, T.; HORI, M.; MAKATANI, M.; YAMAMURA, T.; TANAKA, T.; MATSUDA, Y.; KARAKI, H. Subtypes of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors mediating tracheal smooth muscle contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**: 668-674, 1995.