

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

**EFEITOS DAS ENDOTELINAS E CININAS SOBRE RESPOSTAS NEUROGÊNICAS NO DUCTO
DEFERENTE DE CAMUNDONGO**

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

Prof. Orientador: Dr. Giles A. Rae

JONNY MAAS

**Florianópolis
1995**

**"EFEITOS DAS ENDOTELINAS E CININAS
SOBRE RESPOSTAS NEUROGÊNICAS NO
CANAL DEFERENTE DE CAMUNDONGO"**

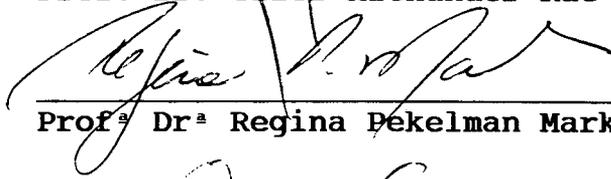
POR

JONNY MAAS

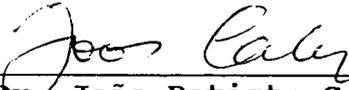
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. Giles Alexander Rae



Prof.^a Dr.^a Regina Bekelman Markus



Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis, março de 1995.

*Dedico esta dissertação às pessoas que
contribuem para a ciência neste País.*

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pelo exemplo de profissionalismo e pelo apoio e estímulo ao meu trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Dr. João Batista Calixto pela contínua colaboração.

À Alcíbia Maia Cardozo e Josane Reischl pela amizade, apoio e assessoria.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo excelente relacionamento e contínua troca de informações, e em especial à Adriana R. Rigon, Adair S. dos Santos e Márcia Souza.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, de modo especial à Rosane Ostrosky, Elizabete Ganzer Ramos e ao ex-funcionário Amaro José da Silva.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	x
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Endotelinas	2
1.2- Cininas	13
1.3- Ducto deferente de camundongo	20
2- OBJETIVOS	21
3- MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1- Animais	22
3.2- Montagem do ducto deferente isolado de camundongo	22
3.3- Experimentos com endotelinas	23
3.4- Experimentos com cininas	24
3.5- Análise estatística	27
3.6- Drogas	27
4- RESULTADOS	29
4.1- Caracterização das contrações provocadas pela estimulação elétrica de campo	29
4.2- Resultados com endotelinas	29
4.2.1- Efeitos dos agonistas endotelinérgicos sobre as contrações neurogênicas	29

4.2.2- Influência do BQ-123 e do BQ-788 sobre as respostas induzidas por endotelina-1 ou endotelina-3	32
4.2.3- Efeitos da big-endotelina-1 sobre as contrações neurogênicas	35
4.3- Resultados com cininas	39
4.3.1- Efeitos da bradicinina e peptídeos relacionados sobre as contrações neurogênicas	39
4.3.2- Influência de antagonistas seletivos para receptores B ₁ ou B ₂ sobre os efeitos da bradicinina ou da [des-Arg ⁹]-BK	43
4.3.3- Efeitos da bradicinina e [des-Arg ⁹]-bradicinina sobre contrações induzidas por ATP e noradrenalina	46
5- DISCUSSÃO	52
5.1- Endotelinas	52
5.2- Cininas	58
SUMMARY AND CONCLUSIONS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1** - Curvas concentração-resposta médias para os efeitos da endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e IRL 1620 nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo 30
- FIGURA 2** - Influência do BQ-123 sobre os efeitos potencializadores da endotelina-1 e da endotelina-3 sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo 33
- FIGURA 3** - Influência do BQ-788 sobre os efeitos da endotelina-1 e da endotelina-3 sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo 36
- FIGURA 4** - Registros isométricos típicos dos efeitos da big-endotelina-1 sobre contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo, na ausência ou presença de fosforamidon 37
- FIGURA 5** - Curvas concentração-resposta médias dos efeitos da big-endotelina-1 ou endotelina-1, sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo, na ausência ou presença de fosforamidon 38
- FIGURA 6** - Registros isométricos típicos dos efeitos da bradicinina e da [des-Arg⁹]-bradicinina sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo 40
- FIGURA 7** - Curvas concentração-resposta médias para os efeitos da bradicinina e da [des-Arg⁹]-bradicinina sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo 41

FIGURA 8 - Influência de antagonistas seletivos para receptores B_2 sobre os efeitos da bradicinina nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo	44
FIGURA 9 - Influência dos antagonistas seletivos para receptores B_2 , sobre respostas da bradicinina, Lys-bradicinina, substância P e endotelina-1 no ducto deferente de camundongo	45
FIGURA 10 - Curvas concentração-resposta médias dos efeitos da bradicinina, no ducto deferente de camundongo na ausência ou presença de [Leu ⁸ ,des-Arg ⁹]-bradicinina	47
FIGURA 11 - Efeitos da [des-Arg ⁹]-bradicinina, no ducto deferente de camundongo na ausência ou presença de antagonistas B_1 ou B_2	48
FIGURA 12 - Influência do [Leu ⁸ ,des-Arg ⁹]-bradicinina sobre os efeitos inibitórios da clonidina ou morfina nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo	49
FIGURA 13 - Registros isométricos típicos dos efeitos da bradicinina sobre contrações induzidas por ATP no ducto deferente de camundongo, na ausência ou presença de antagonistas de receptores B_1 ou B_2	50
FIGURA 14 - Efeitos da bradicinina e da [des-Arg ⁹]-bradicinina sobre contrações induzidas por ATP ou noradrenalina no ducto deferente de camundongo	51
FIGURA 15 - Esquema teórico da possível distribuição dos receptores para endotelinas e dos receptores para cininas, numa junção neuroefetora no ducto deferente de camundongo	64
TABELA 1 - Esquema teórico da possível distribuição dos receptores para endotelinas e dos receptores para cininas, numa junção neuroefetora no ducto deferente de camundongo	31

TABELA 2 - Efeitos de agonistas para receptores de endotelinas sobre respostas neurogênicas no canal deferente de camundongo	34
TABELA 3 - Efeitos das cininas sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo	42

RESUMO

O presente estudo procurou identificar os receptores envolvidos no controle da neurotransmissão simpática do ducto deferente de camundongo pelas ETs, bem como a presença de atividade da enzima conversora para ET nessa preparação. Foram ainda caracterizados os receptores que medeiam os efeitos das cininas sobre essa mesma junção neuromuscular. As contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo foram induzidas por estimulação elétrica de campo com trens de 4 pulsos retangulares de 0.5 ms de duração e voltagem supramáxima, aplicados a uma frequência de 10 Hz a cada 20 s.

Os experimentos realizados com as ETs revelaram que:

1. A ET-1 e a ET-3 (0.01 - 100 nM) potencializaram as contrações neurogênicas, apresentando CE_{50} s (médias geométricas com limites de confiança para 95%) de 0.7 nM (0.4 - 1.6) e 13.7 nM (10.2 - 14.1) e $E_{máx}$ s (médias do aumento \pm E.P.M., em mg por 10 mg de tecido úmido) de 473 ± 35 e 520 ± 51 , respectivamente.
2. O IRL 1620 (Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]ET-1) e a sarafotoxina S6c, ambos agonistas seletivos para receptores de ET ET_B , foram inativos até 100 nM.
3. As respostas à ET-3 foram progressivamente inibidas pelo antagonista seletivo de receptores para ET do tipo ET_A , BQ-123 (ciclo[D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu]) nas concentrações de 10, 30 e 100 nM. A maior concentração de BQ-123 quase aboliu a resposta à ET-3 (100 nM).
4. Em contraste, o BQ-123, nas concentrações de 100, 300 nM e 1 μ M, deslocou a curva da ET-1 à direita somente 2, 5 e 6 vezes, respectivamente.
5. O BQ-788 (*N*-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L- γ -metil-leucil-D-1-metoxicarbonil triptofanil-D-norleucina) (100 nM), um antagonista seletivo para receptores de ET do tipo ET_B , não alterou as respostas à ET-1 ou ET-3 (0.01 - 100 nM).

6. A big-ET (0.3 - 30 nM) foi 10 vezes menos potente que seu metabólito ativo, a ET-1, em potencializar as respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo (CE_{50} 6.8 nM, 4.7 - 9.6; $E_{máx}$ 457 + 37 mg/10 mg de tecido úmido).

7. A pré-incubação com fosforamidon (100 nM) reduziu os efeitos potencializadores da big-ET-1, mas não os da ET-1.

Tais achados permitem concluir que a ET-1 e ET-3 potencializam a neurotransmissão simpática no ducto deferente de camundongo através da estimulação de receptores para ETs insensíveis ao BQ-788, mas que apresentam sensibilidade variada ao bloqueio pelo BQ-123. Resta ser esclarecido se esses resultados refletem a presença (ao menos em parte) de uma população atípica de receptores para ET (possivelmente um subtipo de ET_A) nesse tecido, ou são consequência da ligação da ET-1 e da ET-3 a distintos subdomínios de um único subtipo de receptor ET_A . Finalmente, nossos experimentos também revelaram que esse tecido exibe uma pronunciada atividade da enzima conversora de ET, que é sensível ao bloqueio pelo fosforamidon.

Os experimentos realizados com as cininas revelaram que:

1. A BK (0.1 - 300 nM), a exemplo das ETs, induziu um pronunciado aumento das contrações neurogênicas, com uma CE_{50} de 4.5 nM (1.7 - 11.6) e uma $E_{máx}$ de 315 ± 19 , na presença de captopril 3 μ M.

2. Resultados semelhantes foram obtidos, nas mesmas condições, em preparações expostas à Lys-BK, [Hyp³]-BK, Met,Lys-BK e ao agonista seletivo para receptores B_2 [Tyr(Me)⁸]-BK (0.1 - 300 nM).

3. Os antagonistas seletivos para receptores B_2 , Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸-BK) (1 - 10 nM) e o NPC 17731 (D-Arg-[Hyp³,D-Hyp^E(transpropil)⁷,Oic⁸]-BK)(3 - 30 nM) desviaram à direita, de modo concentração-dependente, a curva para os efeitos potencializadores da BK. O cotejamento gráfico de Schild desses

resultados originou retas de regressão com coeficientes angulares não diferentes de 1, revelando valores aparentes de pA_2 de 9.65 ± 0.09 e 9.08 ± 0.13 para o Hoe 140 e NPC 17731, respectivamente. Ambos os antagonistas (100 nM) falharam em modificar potencializações semelhantes às da BK induzidas por substância P (3 nM) ou ET-1 (1 nM).

4. A pré-incubação das preparações com o antagonista seletivo para receptores de cininas B_1 , [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK (1 μ M), não alterou a CE_{50} da BK, porém aumentou o efeito potencializador de concentrações mais altas do agonista (30 - 300 nM).

5. Contrastando com os efeitos induzidos pela BK, o agonista seletivo para receptores B_1 , [des-Arg⁹]-BK (0.3 - 1000 nM), reduziu a amplitude das contrações neurogênicas de modo significativo e concentração-dependente, com uma CI_{50} de 13.7 nM (10.4 - 16.1) e um $I_{máx}$ de 175 ± 11 .

6. A inibição das respostas neurogênicas induzida pela [des-Arg⁹]-BK (300 nM) não foi afetada por Hoe 140 (30 nM) ou NPC 17731 (100 nM), mas foi abolida pelo antagonista seletivo para receptores B_1 , o [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK (1 μ M), o qual não modificou o efeito inibitório da clonidina (1 nM) ou morfina (300 nM).

7. Em preparações não estimuladas, a BK (100 nM) também potencializou contrações induzidas por ATP (100 μ M), porém não afetou contrações semelhantes induzidas por noradrenalina (10 μ M). Esse efeito potencializador da BK foi inibido pelo Hoe 140 (10 nM) ou pelo NPC 17731 (30 nM), porém foi resistente ao [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK (1 μ M). Por outro lado, a [des-Arg⁹]-BK não modificou as contrações induzidas por ATP ou noradrenalina.

Esses resultados permitem concluir que o ducto deferente de camundongo expressa receptores B_1 e B_2 , que modulam a neurotransmissão simpática de modos opostos. As contrações neurogênicas são inibidas por estimulação de receptores

B_1 , possivelmente pré-juncionais. Por outro lado, o aumento das contrações neurogênicas se dá pela ativação de receptores B_2 , em parte por amplificação da reatividade do músculo liso ao ATP, um co-transmissor simpático nessa junção neuromuscular autonômica.

1- INTRODUÇÃO

Este estudo tem como objetivo principal a caracterização dos receptores que medeiam as respostas para endotelinas e cininas no ducto deferente de camundongo. Nesse contexto, temas como neuromodulação, neurotransmissão e co-transmissão terão amplo destaque, merecendo, assim, especial atenção.

A neurotransmissão caracteriza-se pela exocitose de um mediador decorrente da estimulação apropriada de um neurônio, o qual irá desencadear um efeito direto em uma célula-alvo pós-juncional, que poderá ser um outro neurônio. Há diversos exemplos da liberação simultânea de dois ou mais transmissores de um mesmo neurônio, o que caracteriza um processo denominado de co-transmissão. Nesses casos, os co-transmissores liberados podem ter ações sinérgicas ou opostas nas células-alvo.

O termo "neuromodulador" foi sugerido para indicar um mediador, liberado por uma célula neuronal ou não-neuronal, cujas ações não se adaptam à visão convencional de como deve agir um neurotransmissor. Para que não haja uso indiscriminado do termo, convencionou-se usá-lo em qualquer situação onde ocorra controle da liberação pré-sináptica de transmissores e/ou controle da excitabilidade pós-sináptica, mas na qual não se compreendam as ações do mediador envolvido.

Vários tecidos utilizam mediadores peptídicos para modular e/ou exercer comunicação intercelular. Nesse sentido, peptídeos importantes como angiotensina II, bradicinina e demais cininas, endotelinas, neuropeptídeo Y, neurotensina, peptídeo natriurético atrial, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina,

substância P e vasopressina, entre outros, têm sido freqüentemente relatados como possuidores de diversas ações biológicas relevantes, muito além de uma atividade vasodilatadora e ou vasoconstritora (Regoli *et al.*, 1993).

As endotelinas e cininas são os peptídeos cujos efeitos, sobre o ducto deferente de camundongo, serão abordados neste estudo. As cininas constituem um grupo de peptídeos vasodilatadores potentes, formados a partir de precursores localizados no plasma e/ou em tecidos (Regoli e Barabé 1980). Por outro lado, as endotelinas configuram-se como potentes agentes vasoconstritores produzidos por células endoteliais, entre outras, cuja formação também envolve clivagem de precursores específicos (Battistini *et al.*, 1993). Como esses peptídeos apresentam meias vidas curtas na circulação, possivelmente exercem ações autócrinas e parácrinas locais nos tecidos onde são formados. Assim, configuram-se como típicos moduladores, inclusive com ação neuromodulatória em diversas junções neuroefetadoras.

1.1 -Endotelina

A descoberta da endotelina e do seu mecanismo de ação teve íntima relação com o endotélio. As células endoteliais exercem um importante papel na modulação de vários processos biológicos. Sua importância está relacionada à localização privilegiada dessas células, na interface entre o sangue e a musculatura lisa vascular, como também ao fato de exercerem um papel central na produção e/ou metabolização de agentes capazes de atuar sobre o próprio endotélio, bem como sobre o músculo liso subjacente, entre eles as cininas, as catecolaminas e a angiotensina II (Jaffe, 1987; Vane *et al.*, 1987).

A partir do início da década de 80, foram relatados experimentos que

demonstraram a importância do endotélio na contração do músculo liso vascular induzida por hipóxia em tiras da artéria pulmonar (Holden e McCall, 1983). No ano seguinte, O'Brien e McMurtry (1984) e Agricola *et al.* (1984) detectaram um "fator vasoconstritor dependente do endotélio", presente no sobrenadante da cultura de células endoteliais arteriais, que contraía de forma persistente a artéria pulmonar bovina. Sugeriu-se que esse efeito seria mediado por um composto de natureza peptídica, uma vez que sua atividade foi atenuada pela tripsina (Hickey *et al.*, 1985; Gillespie *et al.*, 1986).

Coube a Yanagisawa *et al.* (1988) o mérito de isolar esse peptídeo, a que chamaram de endotelina (ET), do sobrenadante da cultura de células endoteliais de porco. Nesse estudo, verificou-se que sua estrutura apresenta 21 resíduos de aminoácidos e duas pontes dissulfeto unindo pares de resíduos de cisteína (Cis¹-Cis¹⁵ e Cis³-Cis¹¹). Esse peptídeo era capaz de produzir diversos efeitos biológicos importantes, com destaque ao fato de ser o mais potente vasoconstritor identificado até o momento (cerca de dez vezes mais potente que a angiotensina II). Outro aspecto importante daquele trabalho foi a observação que a ET era produto da clivagem de um pró-peptídeo, denominado de big-ET, por uma suposta enzima-conversora de ET (Yanagisawa *et al.*, 1988). Posteriormente, muitos estudos vieram a demonstrar que a inibição da enzima conversora de ET poderia se constituir numa importante via para o controle de fisiopatologias envolvendo alterações do fluxo sanguíneo e da pressão arterial, de forma semelhante ao que ocorre com os inibidores da enzima conversora para angiotensina e inativadora para bradicinina. Yanagisawa *et al.* (1988) postularam, ainda, que a ET seria um ligante endógeno para canais de cálcio, baseados tanto em sua homologia com venenos de escorpião, como na dependência de cálcio para seu efeito

vasoconstritor, o que mais tarde se mostrou infundado. Outros estudos rapidamente revelaram que a ET, na verdade, pertence a uma família de peptídeos naturais. Inoue *et al.* (1989) demonstraram que o genoma de mamíferos apresenta três genes que codificam três isopeptídeos semelhantes, sendo um deles a ET recém-descoberta por Yanagisawa *et al.* (1988). Por conseguinte, a ET foi renomeada ET-1 e os dois peptídeos adicionais foram chamados de ET-2 e ET-3. Outro isopeptídeo, o "peptídeo intestinal vasoconstritor" ou endothelina- β (Saida *et al.*, 1989), acabou revelando-se como uma variante da ET-2 encontrada em camundongos e ratos (Bloch *et al.*, 1991).

As ETs encontradas em diferentes espécies apresentam grandes homologies estruturais. Assim, a ET-1 proveniente de cão, rato e camundongo revelou-se idêntica à ET-1 humana e porcina. Tampouco existem diferenças estruturais entre as ET-2 humana e canina (embora elas difiram da ET-2 de rato e camundongo), da mesma forma que entre as ET-3 humana e de rato (para revisão, ver Masaki *et al.*, 1992). A família das ETs apresenta, ainda, grande homologia estrutural (50-70%) com as sarafotoxinas S6a, S6b, S6c e S6d, peptídeos presentes no veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (para revisão ver Sokolovsky, 1992). Apesar da estreita homologia estrutural entre as ETs, as atividades biológicas das três isoformas apresentam diferenças consideráveis quanto à natureza das respostas que desencadeiam, devidas principalmente às diferenças de afinidade pelos receptores para ETs (para revisão ver Kochva *et al.*, 1993).

Todas as ETs são formadas em pelo menos duas etapas. A primeira envolve a clivagem proteolítica de pré-pró-ETs distintas, para originar big-ETs específicas. Essas, por sua vez, sofrem clivagem adicional efetuada por uma endopeptidase neutra, chamada de enzima conversora de ET (para revisão de

biorregulação ver Battistini *et al.*, 1993). No caso específico da síntese de ET-1, a pré-pró-ET-1, que contém 203 resíduos de aminoácidos, é clivada por uma endopeptidase neutra específica para aminoácidos básicos pareados, entre os resíduos $\text{Lis}^{52}\text{-Arg}^{53}$ e $\text{Arg}^{91}\text{-Arg}^{92}$. Essa clivagem dá origem a big-ET-1 ou pró-ET-1, um produto intermediário, que contém 39 resíduos de aminoácidos em suínos e 38 em humanos, que então é convertida em ET-1 madura por ação de uma enzima conversora de ET, sensível ao bloqueio pelo fosforamidon, mas não pelo tiorfan (Haynes e Webb, 1993). A enzima conversora de ET sensível ao fosforamidon aparenta ter maior atividade sobre a big-ET-1 que a big-ET-3 (Opgenorth *et al.*, 1992; Télémaque e D'Orléans-Juste, 1991).

Por outro lado, a big-ET-2 e a big-ET-3 humanas possuem 38 e 41 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A enzima conversora de ET cliva a big-ET-1 e a big-ET-2 entre os resíduos $\text{Trp}^{21}\text{-Val}^{22}$, enquanto que a big-ET-3 é clivada entre $\text{Trp}^{21}\text{-Ile}^{22}$ (Yanagisawa *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989). É interessante observar que o fosforamidon, um inibidor de endopeptidases neutras, é capaz de inibir a conversão de todas as big-ETs para suas respectivas formas bioativas (Mattera *et al.*, 1993). Em contraste, o tiorfan, também um inibidor de endopeptidases neutras, inibe apenas a conversão da big-ET-3 (Mattera *et al.*, 1993). Esses resultados sugerem a existência de pelo menos duas enzimas conversoras de ET, uma mais ativa sobre a big-ET-1, sensível ao fosforamidon e insensível ao tiorfan, e outra que converte somente big-ET-3, que é mais sensível ao tiorfan que ao fosforamidon.

A big-ET-1 é equipotente à ET-1 em causar aumento na pressão arterial *in vivo*, mas apresenta apenas 1% da potência da ET-1 em contrair vasos sanguíneos isolados sem endotélio (Kimura *et al.*, 1989). Isso sugere que o precursor da ET-1

é rapidamente convertido em ET-1 e, ainda, que é praticamente desprovido de atividade biológica própria, necessitando ser convertida para induzir um efeito biológico (D'Orléans-Juste *et al.*, 1990).

Experimentos *in vitro* demonstraram que as ETs podem ser degradadas pela endopeptidase neutra 24.11 (EPN 24.11), uma enzima muito mais sensível à inibição pelo fosforamidon do que a enzima conversora de ET (Vijayaraghavan *et al.*, 1990; Fagni *et al.*, 1991). No entanto, convém observar que, embora a localização e as atividades da EPN 24.11 estejam bem caracterizadas, poucos trabalhos têm buscado estabelecer a importância dessa enzima no processamento das ETs.

Os efeitos das ETs (e safarotoxinas) são mediados por pelo menos três receptores específicos e distintos, denominados ET_A, ET_B e ET_C, que pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteínas G e com 7 domínios transmembrana (Haynes e Webb, 1993). A classificação dos receptores para ETs baseia-se em ordens de potência distintas de vários agonistas, na codificação por genes diferentes e na ação seletiva de diversos antagonistas. Talvez a primeira evidência para a existência de diferentes tipos de receptores para as ETs tenha sido o estudo de Warner *et al.* (1989). Esse estudo demonstrou que, no mesentério isolado e perfundido de rato, a ET-3 age principalmente como um vasodilatador, sendo ainda mais potente que a ET-1 para esse efeito. No entanto, nesse mesmo leito vascular, a ET-3 foi menos ativa que a ET-1 em causar vasoconstrição. Os receptores ET_A apresentam o seguinte perfil de afinidade para as ETs: ET-1 > ET-2 >> ET-3 (Arai *et al.*, 1990). Em contraste, os receptores ET_B não discriminam as três isoformas. Os receptores ET_A e ET_B foram caracterizados em nível molecular e são os mais bem estudados e conhecidos (Sakurai *et al.*, 1992). Os receptores ET_C, clonados recentemente em *Xenopus laevis* (Karne *et al.*, 1993), apresentam

maior afinidade à ET-3 que à ET-1 ou ET-2 (Emori *et al.*, 1990; Kurihara *et al.*, 1992), sendo que não há, até o momento, um agonista ou antagonista seletivo para esse tipo de receptor (para revisão sobre receptores de endotelinas ver Huggins *et al.*, 1993).

Os receptores ET_A são bloqueados seletivamente pelos compostos peptídicos BQ-123 e FR 139317 (Ihara *et al.*, 1992a; Aramori *et al.*, 1993) e pelo 5-(dimetilamino)-*N*-(3,4-dimetil-5-isoxazoli)-1-naftalenosulfonamida, um antagonista não-peptídico ativo por via oral (Stein *et al.*, 1994). Por outro lado, receptores do tipo ET_B são ativados seletivamente por safarotoxina S6c, BQ-3020 e IRL-1620 (Williams *et al.*, 1991; Ihara *et al.*, 1992b; Takai *et al.*, 1992), e bloqueados por BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1994) e RES-701-1 (Tanaka *et al.*, 1994). Alguns antagonistas apresentam perfil de ação não-seletivo, isto é, bloqueiam tanto receptores ET_A quanto ET_B. É o caso do peptídeo PD 142893 (Cody *et al.*, 1992), e de diversas drogas não-peptídicas como o Ro 46-2005 (Clozel *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1993), o bosentan (Clozel *et al.*, 1994) e o SB 209670 (Ohlstein *et al.*, 1994).

Em adição, evidências funcionais apontam para subtipos de receptores ET_A e ET_B ou ainda, receptores atípicos (Bertelsen *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1993, 1994; Kumar *et al.*, 1993, 1994; Warner *et al.*, 1993a). Nesse sentido, estudos recentes apontam para a existência de dois subtipos de receptores ET_A e dois subtipos de receptores ET_B (Sudjarwo *et al.*, 1994). Tal proposta, por enquanto, baseia-se unicamente na afinidade diferencial dos receptores para diversos agonistas e antagonistas. Portanto, estudos futuros serão necessários para comprovar a teoria dos subtipos de receptores ET_A e ET_B.

O processo vasoconstritor mediado pelos receptores do tipo ET_A e ET_B

envolve a estimulação da fosfolipase C via uma proteína G específica (Takuwa *et al.*, 1990; Sakamoto *et al.*, 1993). Associada a essa estimulação, verifica-se uma elevação nos níveis de fosfatos de inositol e diacilglicerol. A formação de inositol 1,4,5-trifosfato ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) estimula a liberação de cálcio a partir de depósitos intracelulares (Resink *et al.*, 1988; Kasuya *et al.*, 1989), o que gera um aumento transiente da concentração citosólica de cálcio. No entanto, esse aumento é seguido de um acréscimo sustentado da concentração do íon, resultante do influxo de cálcio externo (Simonson *et al.*, 1990). Isso sugere que, em conjunto com a formação de fosfatos de inositol, as ETs ativam canais de cálcio operados por receptores ou facilitam a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. A geração de diacilglicerol, o qual promove a ativação de uma proteína quinase C com conseqüente fosforilação protéica, foi demonstrada em células musculares lisas (Griendling *et al.*, 1989; Sunako *et al.*, 1990), fibroblastos 3T3 (Takuwa *et al.*, 1989) e em células da pituitária anterior (Stojilkovic *et al.*, 1990).

O aumento na formação de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ em fibroblastos 3T3 expostos à ET-1 é de curta duração. Em contraste, a formação de diacilglicerol permanece sustentada por um período maior (Takuwa *et al.*, 1989). Uma análise detalhada da hidrólise do $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ sugere que o término das respostas desse segundo mensageiro resulta unicamente da dessensibilização da fosfolipase C (Cook *et al.*, 1990). Desse modo, a produção contínua de diacilglicerol exige uma via alternativa. Estudos recentes indicam que essa via possivelmente seja através da ativação da fosfolipase D, promovendo a formação de ácido fosfatídico, a partir da fosfatidilcolina e sua posterior conversão em diacilglicerol (MacNulty *et al.*, 1990; Ambar e Sokolovsky, 1993). A estimulação da fosfolipase D pelas ETs pode

ocorrer por via direta ou através da estimulação de proteína quinase C (Billah *et al.*, 1991).

Por outro lado, a ET-1 também é capaz de ativar a fosfolipase A_2 , promovendo, por essa via, a formação de ácido araquidônico com conseqüente geração de tromboxanos, leucotrienos ou lipoxinas, dependendo do tipo celular envolvido. Pulmões isolados de rato e cobaia secretam prostaglandina e tromboxano A_2 quando perfundidos com ET-1 (De Nucci *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1992). No entanto, o efeito broncoconstritor da ET-1 *in vivo*, em cobaias parece ser mediado inteiramente por tromboxano A_2 , pois é abolido por inibidores da cicloxigenase (Payne e Whittle, 1988; Braquet *et al.*, 1989) e por antagonistas de receptores para tromboxano A_2 (Schumacher *et al.*, 1990; Lueddeckens *et al.*, 1993). Um importante aspecto, quanto ao tipo celular exposto à ação da ET-1 e conseqüente resposta, aparece nos experimentos com baço e rim de coelho, onde a inibição da síntese de eicosanóides pela via da cicloxigenase potencializa os efeitos do peptídeo (Rae *et al.*, 1989). No útero, a inibição da atividade da fosfolipase A_2 reduz a efeito contracturante da ET-1 (Resink *et al.*, 1990), entretanto, isso não ocorre na artéria coronária de porco (Kozuka *et al.*, 1990). Possivelmente, a ativação da fosfolipase A_2 é mediada por uma proteína G em função da ativação do receptor para ET (Reynolds *et al.*, 1989). Porém, outros autores sugerem que a ativação da fosfolipase A_2 é conseqüência do aumento do cálcio citosólico decorrente da estimulação da fosfolipase C (Sokolovsky, 1992).

Como relatado acima, parte do efeito vasodilatador das ETs pode ser mediado pela ativação da fosfolipase A_2 , em função da geração de prostaglandina I_2 e/ou prostaglandina E_2 (De Nucci *et al.*, 1988; Resink *et al.*, 1989; Warner *et al.*, 1989). Em adição, o efeito vasodilatador da ET-1 ou da ET-3 pode resultar

da formação de óxido nítrico pelo endotélio vascular (De Nucci *et al.*, 1988; Ishii *et al.*, 1991), com conseqüente ativação de uma guanilato ciclase solúvel presente em células musculares lisas (Ignarro, 1989). A formação endotelial de óxido nítrico parece ser controlada por receptores ET_B sensíveis ao bloqueio pelo PD 142893 (Warner *et al.*, 1993a). Dessa forma, a vasodilatação inicial de curta duração em resposta à ET-1, observada na pressão arterial em várias espécies de animais estudadas, pode ser explicada como decorrente da ativação de receptores ET_B localizados no endotélio, enquanto a ativação dos subtipos ET_A e ET_B , localizados no tecido muscular liso, medeia o componente vasoconstritor (Davenport e Maguire, 1994).

Embora o endotélio seja capaz de sintetizar apenas ET-1, as três isoformas são sintetizadas por uma grande variedade de tecidos biológicos. Esses peptídeos ocorrem na musculatura lisa vascular e não-vascular, células epiteliais dos tratos respiratório, gastrintestinal, urogenital e renal, fibroblastos, leucócitos, hipófise e várias áreas do sistema nervoso central e periférico (para revisões ver Masaki *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1992). É interessante observar que cerca de 60% da ET-1 circulante é removida da circulação pulmonar de rato ou cobaia em uma única passagem, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dessa forma, é possível que a ET-1 formada pelo endotélio vascular seja mais um mediador de atuação autócrina e parácrina local do que um hormônio ou fator circulante. Além disso, as ETs produzidas em outros tipos de células possivelmente atuam também como fator de funções locais (Simonson, 1993).

Numerosos agentes são capazes de estimular a produção e liberação de ET em cultura de células endoteliais, incluindo a trombina, forbol éster, fator de crescimento tumoral β , angiotensina II e arginina-vasopressina (para revisões,

ver Masaki *et al.*, 1992; Battistini *et al.*, 1993; Rubanyi e Polokoff, 1994). A adrenalina e o ionóforo de cálcio A23187 também aumentam a expressão do gene para a pré-pró-ET (Yanagisawa *et al.*, 1988). Está bem estabelecido que a liberação de ET envolve síntese *de novo* do peptídeo, simultânea ao estímulo, uma vez que não ocorre armazenamento vesicular do peptídeo já formado.

A produção de ET por uma grande variedade de células, incluindo neurônios periféricos e centrais (Shinmi *et al.*, 1989; Matsumoto *et al.*, 1989), justifica a grande gama de seus efeitos em diferentes sistemas. No sistema cardiovascular, além de ser um potente vasoconstritor e agente hipertensivo, a ET-1 inibe a neurotransmissão simpática na artéria femoral de cobaia (Wiklund *et al.*, 1988) e no coração de ratos (Reid *et al.*, 1989). Porém, atua como potencializador das contrações mediadas por terminações nervosas simpáticas na artéria pulmonar de cobaia (Wiklund *et al.*, 1989a) e no mesentério arterial (Tabuchi *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1990) e venoso perfundidos de rato (Warner *et al.*, 1990). Além disso, a ET-1 também atua em junções autonômicas simpáticas não-vasculares, potencializando as contrações de origem neurogênica do ducto deferente de cobaia (Wiklund *et al.*, 1990), rato (Maggi *et al.*, 1989; Wiklund *et al.*, 1990; Donoso *et al.*, 1992), e camundongo (Rae e Calixto, 1990), em parte por aumentar a sensibilidade do músculo liso ao ATP e noradrenalina.

Baseados nas potências semelhantes da ET-1 e da ET-3 em aumentarem as respostas neurogênicas do ducto deferente de rato, Télémaque e D'Orleans-Juste (1991) sugeriram que esse tecido contém receptores do tipo ET_B. Entretanto, essa suposição foi fortemente questionada por resultados de estudos recentes, nos quais o agonista seletivo para receptores ET_B, sarafotoxina S6c, foi aproximadamente 300 vezes menos potente que a ET-1 e, ainda, que o BQ-123, um

antagonista seletivo para receptores ET_A , e o PD 142893, um antagonista não-seletivo para receptores ET_A e ET_B , antagonizaram os efeitos da ET-3, mas não os da ET-1 (Eglezos *et al.*, 1993; Warner *et al.*, 1993a). Por outro lado, no ducto deferente de camundongo a ET-3 é aproximadamente 30 vezes menos potente que a ET-1 (Rae e Calixto, 1990). Esse resultado sugere que o receptor que medeia essas respostas no ducto deferente de camundongo seja do tipo ET_A .

Parte do presente estudo tem por objetivo caracterizar de modo mais conclusivo o receptor que medeia as ações das ETs sobre as contrações neurogênicas simpáticas do ducto deferente de camundongo. Para tal, serão avaliados os efeitos de agonistas seletivos para receptores ET_B , sarafotoxina S6c e IRL 1620 (Williams Jr. *et al.*, 1991; Takai *et al.*, 1992), bem como as influências do BQ-123, um antagonista seletivo para receptores ET_A (Ihara *et al.*, 1992a), e do BQ-788, um antagonista seletivo para receptores ET_B (Ishikawa *et al.*, 1994), sobre as ações da ET-1 ou ET-3 nas contrações de origem neurogênicas no ducto deferente de camundongo.

Por outro lado, a big-ET-1, o precursor imediato da ET-1, é quase tão potente quanto a ET-1 em potencializar respostas neurogênicas no ducto deferente de rato, sendo que esse efeito é inibido na presença de fosforamidon (Télémaque e D'Orléans-Juste, 1991; Mattera *et al.*, 1993). Essa constatação sugere, fortemente, que o ducto deferente de rato apresenta atividade pronunciada de enzima conversora de ET. Além disso, convém salientar que, considerando o fato de o fluido seminal conter altos níveis de ET-1 e de seu precursor (Casey *et al.*, 1992; Hammami *et al.*, 1994), a presença de enzima conversora de ET no ducto deferente pode indicar um possível papel fisiológico da ET-1 nesse tecido. Também faz parte dos objetivos deste estudo a investigação da ocorrência da enzima conversora de ET no ducto deferente de camundongo.

1.2- Cininas

A bradiginina (BK; Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e outro peptídeo intimamente relacionado a ela, a calidina (lys-BK), são potentes substâncias vasoativas. A primeira evidência da existência das cininas foi obtida por Abelous e Bardier (1909), que descreveram a resposta hipotensora à injeção intravenosa de urina. Com os estudos de Werle e colaboradores (Kraut *et al.*, 1930; para revisão, ver Bhoola *et al.*, 1992), ficou claro que o efeito hipotensivo da urina deve-se à presença de enzimas específicas, as calicreínas, que atuam sobre substratos protéicos, denominados cininogênios, originando a calidina. Posteriormente, Rocha e Silva *et al.* (1949) relataram a presença de uma substância no sangue que contraía, de modo lento e progressivo, o íleo isolado de cobaia. Esse composto era formado quando a tripsina e alguns venenos de cobra eram incubados com soro. Em virtude de contrair lentamente preparações de músculo liso, o composto foi denominado de BK. Uma década depois, a BK foi seqüenciada por Elliot *et al.* (1960) e sintetizada por Boissonnas *et al.* (1960). A partir da disponibilidade de BK sintética, inúmeros trabalhos passaram a relatar importantes ações mediadas por esse peptídeo.

De modo semelhante ao que ocorre com as ETs, as cininas não são armazenadas na sua forma bioativa. Elas são formadas em resposta a estímulos inflamatórios, entre outros, a partir da clivagem proteolítica de α -globulinas cininogênicas de alto (APM, M_r 110.000) ou baixo peso molecular (BPM, M_r 70.000), pela ação de diversas proteases denominadas cininogenases, incluindo as calicreínas. As calicreínas são divididas em dois tipos principais: tecidual e plasmático (Fiedler, 1979; Movat, 1979). Um único gene codifica a calicreína plasmática (Seidah *et al.*, 1989), enquanto que a tecidual é resultado da

decodificação de múltiplos genes que exibem diferentes padrões de expressão nos tecidos (Mason *et al.*, 1983). A pré-caliceína (fator de Fletcher) presente no plasma é o precursor inativo da enzima caliceína. Um dos ativadores endógenos, principalmente no contexto da inflamação, é o fator de Hageman (fator XII da seqüência de coagulação sangüínea), que normalmente está no plasma na sua forma inativa e é ativado por contato com superfícies negativamente carregadas. As cininas recém-formadas participam em diversos processos fisiológicos, principalmente naqueles relacionados a processos inflamatórios agudos (para revisão, ver Bhoola *et al.*, 1992).

A caliceína tecidual (ou glandular), capaz de catalisar a formação de bradicinina (BK) e Lis-BK a partir de cininogênios APM e BPM, é encontrada em glândulas salivares, pâncreas, rins, coração (Britos e Nolly, 1981; Zeitlin *et al.*, 1989), musculatura lisa vascular (Nolly *et al.*, 1985), glândulas prostática e submandibular (Chao e Chao, 1987), pituitária (Powers e Nasjletti, 1984) e musculatura esquelética (Shimojo *et al.*, 1987). É também encontrada, em baixas concentrações, na circulação (Rabito *et al.*, 1982). Todas essas evidências sugerem um papel de destaque da BK na modulação de importantes processos biológicos em uma série de tecidos.

Após a formação, as cininas são rapidamente degradadas por peptidases teciduais. As vias bioquímicas relacionadas com a síntese e o metabolismo das cininas envolvem mecanismos bem estabelecidos (para revisão ver Regoli e Barabé, 1980; Bhoola *et al.*, 1992). As principais enzimas que inativam a BK e cininas relacionadas são denominadas cininases. Duas endopeptidases, neutras que promovem a hidrólise seletiva de cininas foram parcialmente purificadas no tecido cerebral de coelho por Camargo *et al.* (1972). Atualmente, essas enzimas são denominadas

de cininase I e cininase II. É interessante comentar que a hidrólise da BK pela cininase I resulta na formação da [des-Arg⁹]-BK, um octapeptídeo com alta afinidade pelo receptor B₁ (Marceau e Regoli, 1991), e que a cininase II é também responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II. As duas enzimas já foram clonadas e os RNAm para suas sínteses foram encontrados em diversos tecidos (para revisão sobre a biorregulação das cininas ver Bhoola *et al.*, 1992).

Ao analisarem a relação de potência para vários análogos das cininas, Regoli e Barabé (1980) conseguiram classificar os receptores para cininas em dois tipos, denominados B₁ e B₂. Os receptores para cininas do tipo B₁, na aorta de coelho, apresentam o seguinte perfil de afinidade para agonistas análogos às cininas: [des-Arg⁹]-BK > [Tyr(Me)⁸]-BK > BK. Por outro lado, os agonistas expressam a seguinte ordem de potência para os receptores B₂ na veia jugular de coelho, íleo de gato e útero de rato: [Tyr(Me)⁸]-BK > BK > [des-Arg⁹]-BK, (para revisão ver Hall, 1992). Um terceiro tipo de receptor para cininas parece estar presente na microvasculatura da porção posterior do cérebro de cobaia, onde o agonista seletivo para receptores B₁, [des-Arg⁹]-BK, foi inativo e o agonista seletivo para receptores B₂, [Tyr(Me)⁸]-BK, apresentou atividade agonística parcial. Além disso, a vasoconstrição induzida pela BK foi atenuada pelo antagonista seletivo para receptores B₁, [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK, e pelo antagonista seletivo para receptores B₂, D-Arg-[Hyp³,D-Phe⁷]-BK (Cohen-Laroque, *et al.*, 1990). A presença de receptores atípicos para cininas foi também observada em cultura de células endoteliais da aorta bovina (Wiemer e Wirth, 1992; Wirth *et al.*, 1992), em cultura de células mesangiais de rato (Issandou e Darbon, 1991), e no trato respiratório (Farmer *et al.*, 1989; 1991). A proposta para existência de subtipos de receptores B₂ foi também sugerida em preparações isoladas de ducto

deferente de rato (Llona *et al.*, 1987; Rifo *et al.*, 1987).

Embora seja muito provável que existam subtipos de receptores para cininas, os resultados acumulados até o momento ainda são insuficientes para determinar se realmente se tratam de receptores novos ou mesmo subtipos de receptores. Por exemplo, resultados incomuns podem ser decorrentes do estudo com espécies animais diferentes. Além disso, é possível que diferenças, quanto ao perfil de ação dos agonistas e antagonistas em receptores para cininas, devam-se a múltiplos sítios de ligação de agonistas e antagonistas com tais receptores (para revisão sobre os receptores para cininas ver Hall *et al.*, 1993).

Os receptores B_2 são os mais comumente encontrados e apresentam ampla distribuição tecidual (Farmer e Burch, 1991; Bhoola *et al.*, 1992). A clonagem do receptor B_2 , por McEachern *et al.* (1991), demonstrou que o mesmo pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G. A ativação dos receptores B_2 é capaz de estimular a formação de inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol, com conseqüente liberação de cálcio e fosforilação protéica, a partir da ativação de uma fosfolipase C específica (Farmer e Burch, 1991). Os efeitos da BK podem também ser decorrentes da ativação da fosfolipase A_2 promovida pelos receptores B_2 em diversos tecidos, com formação de diversos derivados do ácido araquidônico, pelas vias da cicloxigenase e da lipoxigenase (Burch e Axelrod, 1987; Slivka e Insel, 1988). Entretanto, a formação do ácido araquidônico pode se dar através da ativação da diacilglicerol-lipase (DA-lipase). Isso sugere que a formação dos derivados do ácido araquidônico ocorre por múltiplas vias. Em adição, os receptores B_2 são capazes de ativar a fosfolipase D e uma fosfolipase C específicas, capazes de promover a hidrólise do ácido fosfatídico (Horwitz, 1991; Purkiss *et al.*, 1991). A BK aumenta o AMPc de forma indireta em diversos

tecidos, na maioria dos casos pela formação de prostaglandinas (Stoner *et al.*, 1973; Brunton *et al.*, 1976). No entanto, o aumento de AMPc induzido por BK no duodeno isolado de rato está diretamente relacionado à ativação de receptores B₂ (Liebmann *et al.*, 1987). Um dos efeitos mais importantes decorrentes da ativação de receptores B₂ é o que relaciona o aumento do GMPc, secundário à formação NO a partir de células endoteliais (Boulanger *et al.*, 1990), em conjunto com a estimulação do influxo de cálcio por canais ativado por receptores (Graier *et al.*, 1992).

Já em meados dos anos 70 se suspeitava que a BK interagisse com populações distintas de receptores para cininas, porém, a confirmação da existência de receptores B₁ só foi possível graças à síntese de um composto derivado da BK, a [des-Arg⁹]-BK. Esse peptídeo apresenta aproximadamente 6 vezes mais afinidade pelo receptor B₁ do que a BK, sendo praticamente inativo em preparações que contêm apenas receptores B₂ (para revisão ver Hall, 1992).

Os receptores B₁ apresentam localização restrita, sendo encontrados principalmente nos leitos vasculares, onde normalmente coexistem com os receptores B₂. A expressão dos receptores B₁ foi investigada em cultura de células da artéria pulmonar bovina (Cahill *et al.*, 1988), fibroblastos de humanos (Goldstein e Wall, 1984) e coelho (Marceau e Tremblay, 1986).

Um importante aspecto relacionado aos receptores B₁ está na sua capacidade de sofrer pronunciada indução. Vários tecidos podem vir a expressá-los em resposta a determinados estímulos indutivos, geralmente associados à injúria tecidual. Tal característica reflete num aumento da responsividade da bradicinina ao longo do tempo, fato observado em diversas preparações de tecidos vasculares e não-vasculares *in vitro* e não-vasculares *in vivo* (para revisão ver Hall, 1992).

Desse modo, os receptores B_1 , devido à sua capacidade de sofrer indução, podem ser classificados como sendo de natureza constitutiva ou induzida.

A clonagem do receptor B_1 por Menke et al. (1994) demonstrou que ele pertence à família de receptores ligados à proteína G, possuindo sete domínios transmembrana e com uma sequência de aminoácidos muito próxima daquela apresentada pelos receptores B_2 . O receptor B_1 é capaz de desencadear uma série de eventos intracelulares, dependendo do tipo celular envolvido. Nas células endoteliais da aorta bovina, o agonista seletivo para receptores B_1 , a [des-Arg⁹]-BK, estimula a liberação de óxido nítrico e prostaglandina I_2 (D'Orléans-Juste et al., 1989). Em células endoteliais da artéria pulmonar de bovina e em tecido pulmonar de novilhos, a [des-Arg⁹]-BK também induz a liberação de óxido nítrico (Sung et al., 1988; Cahill et al., 1988). A [des-Arg⁹]-BK induz ainda, a síntese de prostaglandina I_2 em células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (Cahill et al., 1988). Em fibroblastos do pulmão de fetos humanos, a [des-Arg⁹]-BK estimula a síntese protéica, divisão celular, sem estimular a síntese de prostaglandinas (Goldstein e Wall, 1984). Na aorta isolada de coelho, as respostas contracturantes mediadas pelos receptores B_1 não são influenciadas por inibidores da cicloxigenase (Regoli e Barabé, 1980). Neste tecido, as respostas contráteis são fortemente dependentes do influxo de cálcio, independentes da ativação da proteína quinase C (Calixto e Medeiros, 1992a). Em contraste, na veia porta de rato, o mecanismo contracturante desencadeado pela bradicinina e [des-Arg⁹]-BK envolve, além do influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C (Campos e Calixto, 1994).

Desse modo, a BK e a calidina evocam uma série de respostas biológicas como broncoconstrição, dor, edema, hipotensão e tosse. No sistema cardiovascular,

as cininas promovem vasodilatação (Skeggs *et al.*, 1956) e estase sangüínea em capilares (Boissonnas *et al.*, 1960). Ainda, as cininas contraem ou relaxam uma variedade de músculos lisos no intestino, trato geniturinário e respiratório e em outros tecidos periféricos (Burch *et al.*, 1990; Farmer e Burch, 1991). Em adição aos seus generalizados efeitos biológicos, a BK pode também modificar a neurotransmissão em determinadas junções neuroefetoras autonômicas do trato urogenital. Neste sentido, a BK potencializa as contrações neurogênicas da bexiga isolada de rato, possivelmente pelo aumento da sensibilidade da musculatura lisa ao ATP, um co-transmissor simpático nesse tecido (Acevedo *et al.*, 1990). De modo semelhante, esse peptídeo aumenta as respostas à estimulação elétrica do ducto deferente de cobaia (Zetler e Kampmann, 1979) ou rato (Huidobro-Toro *et al.*, 1986; Tousignant *et al.*, 1987). No ducto deferente de rato, a BK também aumenta a liberação de noradrenalina marcada, potencializa as respostas ao ATP, mas não à noradrenalina, e causa contração direta da musculatura lisa (Llona *et al.*, 1987, 1991; Donoso *et al.*, 1989). Esses efeitos parecem ser mediados via estimulação de receptores B_2 (Llona *et al.*, 1987; Rifo *et al.*, 1987). Os autores sugeriram que os receptores B_2 que medeiam os efeitos musculotrópicos (pós-juncionais) são diferentes daqueles que medeiam os efeitos em nível das terminações nervosas simpáticas (pré-juncionais). A BK também é capaz de liberar adrenalina das células adrenocromafins e noradrenalina dos gânglios simpáticos (Collier, 1970). Llona *et al.* (1991) relataram que a BK também aumenta a liberação de noradrenalina a partir de nervos simpáticos no ducto deferente de camundongo. No entanto, os efeitos da BK sobre a neurotransmissão nessa preparação não foram caracterizados por completo.

1.3- Ducto deferente de camundongo

A descarga neuronal simpática no ducto deferente de camundongo apresenta liberação simultânea de múltiplos mediadores, num claro processo de co-transmissão envolvendo ATP, noradrenalina e, mais freqüentemente em descargas de alta freqüência, neuropeptídeo Y (Stjärne *et al.*, 1986; von Kugelgen *et al.*, 1989; Drake e Petersen, 1992). A noradrenalina exógena produz uma contração sem mediar eventos elétricos, por ativação de receptores pós-juncionais do tipo α_1 . Mais recentemente, constatou-se a participação adicional de receptores pós-juncionais do tipo α_2 na resposta contrátil da noradrenalina (von Kugelgen *et al.*, 1989). No entanto, a ativação de receptores pré-juncionais do tipo α_2 inibe a liberação de ATP e noradrenalina (von Kugelgen *et al.*, 1989). Em contraste, o ATP exógeno induz uma resposta contrátil discreta, do tipo eletromecânica, por ativação de purinoceptores P_{2x} , promovendo a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes (Sneddon e Burnstock 1984). Por outro lado, o ATP pode causar relaxamento em preparações de ducto deferente de camundongo, na presença de antagonistas P_{2x} , através da ativação de receptores P_{2y} (Boland *et al.*, 1992).

As contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo são suscetíveis à modulação por uma variedade de mediadores. Entre os agentes que podem inibir a contrações neurogênicas destacam-se agonistas α_2 -adrenoceptores (Illes e Starke, 1983), agonistas de purinoceptores (Kurz *et al.*, 1993), opióides (Lord *et al.*, 1977), neuropeptídeo Y (Stjärne *et al.*, 1986) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Manzani e Parlani, 1992). Por outro lado, as contrações neurogênicas são potencializadas pelas ETs (Rae e Calixto, 1990) e taquicininas (Manzini e Parlani, 1992).

2- OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Caracterizar o receptor que medeia as ações das ETs no ducto deferente de camundongo através do uso de agonistas e/ou antagonistas seletivos para receptores ET_A ou ET_B .
2. Investigar se o ducto deferente de camundongo apresenta atividade significativa da enzima conversora de ET-1.
3. Avaliar as ações das cininas sobre a neurotransmissão simpática do ducto deferente de camundongo.
4. Caracterizar, usando agonistas e/ou antagonistas seletivos para receptores B_1 ou B_2 , os receptores que medeiam as ações das cininas no ducto deferente de camundongo.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Os experimentos foram conduzidos com camundongos suíços albinos, pesando entre 25 a 35 g, criados no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (10 a 15 por gaiola) mantidas em temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

3.2- Montagem do ducto deferente isolado de camundongo

Sob anestesia leve com éter, os animais foram sacrificados com um golpe na cabeça e deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta para retirada dos canais deferentes, que foram colocados numa placa de Petri contendo solução de Krebs morna (ver composição abaixo), para remoção dos excessos de tecidos adiposo e conjuntivo. Cada ducto deferente foi então transferido para uma cuba contendo 5 ml de solução de Krebs à 37 °C, continuamente gaseificada com 95% O₂ e 5% CO₂, e submetido a uma tensão inicial de 0.5 g. A solução de Krebs tinha a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5; NaHCO₃; KH₂PO₄ 0.9 e glicose 11 (pH 7.2 - 7.4). Foi estabelecido um período de equilíbrio de pelo menos 45 a 60 min antes da adição de drogas ou início da estimulação elétrica de campo, durante o qual a solução nutriente foi renovada a cada 15 min.

A estimulação de campo foi induzida usando-se trens de 4 pulsos retangulares de 0.5 ms e voltagem supramáxima (65-70 V), numa frequência de 10 Hz a cada 20 s. A estimulação foi aplicada através de eletrodos de platina (0.6 mm de diâmetro) que consistiram de um gancho situado 3 cm abaixo de um anel de

8 mm de diâmetro. Cada preparação foi posicionada entre os dois eletrodos, conectada com linha de sutura a um transdutor isométrico e distendida a uma tensão basal de pelo menos 0.2 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).

3.3- Experimentos com endotelina

Uma vez estabilizadas as contrações induzidas pela estimulação elétrica de campo, foi obtida uma única curva concentração-resposta cumulativa para os efeitos potencializadores da ET-1, ET-3, sarafoxotoxina S6c ou IRL 1620 (0.01 a 100 nM). Em outros experimentos avaliamos a influência do BQ-123, antagonista seletivo para receptores ET_A (10 nM a 1 μ M), e do antagonista seletivo para receptores ET_B , BQ-788 (100 nM), sobre a potencialização das contrações neurogênicas induzidas pelas ETs. Para isso, preparações distintas foram expostas a uma única concentração de um dos antagonistas ou veículo (igual volume de tampão fosfato) por 30 min, e uma única curva concentração-resposta para ET-1 ou ET-3 foi obtida em sua presença. A especificidade da ação do BQ-123, contra as respostas induzidas pelas ETs, foi confirmada testando-se sua influência sobre as potencializações induzidas por concentrações equiefetivas de ET-1 (1 nM), ET-3 (30 nM), BK (30 nM, na presença de captopril 3 μ M) ou substância P (3 nM). Após uma exposição inicial à BK ou substância P (por 2 minutos, sendo que após isso as preparações foram lavadas várias vezes), o BQ-123 foi adicionado ao banho e, 30 min depois, outra resposta ao mesmo agonista foi obtida na sua presença. Entretanto, devido à baixa reprodutibilidade das potencializações induzidas pelas ETs, os canais deferentes de um mesmo camundongo foram expostos somente uma vez

à ET-1 ou ET-3, um deles na presença e o outro na ausência de BQ-123 (300 nM).

Outra série de experimentos foi conduzida com o propósito de investigar a ocorrência de enzima conversora de ET. Em cada ducto deferente foi obtida uma única curva concentração-resposta à ET-1 ou ao seu precursor imediato, big-ET-1 (0.01 a 30 nM), na ausência (somente veículo, i.e. tampão fosfato) ou na presença de fosforamidon (100 μ M, incubado 45 min antes do início da curva ao agonista).

Em todos os experimentos, somente uma curva concentração-resposta foi obtida com quaisquer das ETs. Também, apenas uma concentração de antagonista para receptor de ETs foi testada em cada preparação. Ao término de cada experimento o tecido foi colocado em papel filtro e pesado.

3.4- Experimentos com cininas

Exceto quando especificado, a solução de Krebs utilizada nesses experimentos também conteve captopril (3 μ M) para prevenir a ação da cininase II. Seguindo-se a estabilização das contrações induzidas por estimulação elétrica de campo, curvas concentração-resposta não-cumulativas foram obtidas para os efeitos potencializadores da BK, Lys-BK, Met,Lys-BK, [Tyr(Me)⁸-BK ou [Hyp³]-BK, e ao efeito depressor sobre as contrações neurogênicas da [des-Arg⁹]-BK (0.1 a 300 nM). Cada concentração do agonista foi adicionada ao meio por 1 a 2 min, a intervalos de 30 min. Após cada exposição a solução nutriente foi renovada 5 vezes. A estimulação elétrica de campo foi interrompida assim que a resposta ao agonista decaía, sendo reiniciada 5 min antes da adição da concentração seguinte do agonista.

Em outros experimentos, foram obtidas curvas concentração-resposta completas para o efeito potencializador da BK (0.1 a 300 nM), na ausência ou

presença de diferentes concentrações dos antagonistas seletivos para receptor B_2 , Hoe 140 (1 a 10 nM) ou NPC 17731 (3 a 30 nM), os quais foram incubados 5 min antes de cada adição da BK. Foi realizada somente uma curva concentração-resposta completa à BK em cada preparação. Os experimentos controles foram conduzidos na presença do veículo utilizado para diluir os antagonistas (tampão fosfato). Os valores de pA_2 aparentes (os co-logaritmos da constante de dissociação de equilíbrio do antagonista, ou seja, o " K_B ") para Hoe 140 e NPC 17731 foram estimados pelos deslocamentos à direita que eles causaram sobre a curva concentração-resposta à BK. Utilizamos para isso, diferentes concentrações do antagonista. O valor do pA_2 aparente para cada antagonista foi determinado a partir de um cotejamento gráfico de Schild, relacionando o logaritmo menos 1 das CE_{50} (RCE -1) versus o logaritmo da concentração do antagonista, calculado por análise de regressão linear (Arunlakshana e Schild, 1959). O antagonismo foi considerado como sendo competitivo quando o coeficiente angular da curva de regressão linear não diferiu significativamente da unidade (Kenakin, 1993).

Outros experimentos foram realizados para avaliar a influência do antagonista seletivo de receptor B_1 [Leu^8 , des- Arg^9]-BK sobre os efeitos induzidos pela BK. Nesses experimentos, o antagonista (1 μM) foi adicionado ao banho 5 min antes de cada adição de BK. Foram também examinados os efeitos da [Leu^8 , des- Arg^9]-BK (1 μM), assim como os do Hoe 140 (100 nM) ou do NPC 17731 (100 nM), contra as inibições das contrações neurogênicas induzidas pela [$des-Arg^9$]-BK (300 nM). Após a obtenção de uma primeira resposta controle à [$des-Arg^9$]-BK, cada antagonista foi adicionado ao banho por 5 min e uma segunda resposta do agonista foi obtida em sua presença. As especificidades da ação do Hoe 140 e do NPC 17731, contra respostas induzidas por BK, foram confirmadas testando-se suas influências nas

potencializações induzidas por concentrações equiefetivas de BK (300 nM), Lys-BK (300 nM), substância P (3 nM) ou ET-1 (1 nM). A especificidade da ação da [Leu⁸, des-Arg⁹]-BK foi analisada testando-se sua influência contra a inibição induzida por clonidina (1 nM) ou morfina (300 nM). Para cada agonista foram avaliadas duas respostas consecutivas, primeiro na ausência (controle) e então, 30 min depois, na presença do antagonista. Porém, devido à reprodutibilidade baixa da potencialização induzida pela ET-1 no ducto deferente de camundongo (Rae e Calixto, 1990), os dois canais deferentes de um mesmo animal foram expostos somente uma vez à ação do agonista, sendo que em apenas um deles isso ocorria na presença do antagonista para receptor B₂.

Em outros experimentos, preparações não submetidas à estimulação elétrica de campo foram repetidamente expostas por 1 min, a intervalos de 30 min, ao ATP (100 μM) ou à noradrenalina (10 μM), em concentrações que causaram contrações semelhantes, em magnitude, àquelas evocadas pela estimulação elétrica de campo. Após a estabilização das respostas à noradrenalina ou ao ATP (geralmente após 2-3 exposições), adicionou-se BK (100 nM) ao meio por 30-45 s e uma nova resposta ao agonista foi obtida na presença do peptídeo. Uma exposição final ao ATP ou à noradrenalina foi também conduzida na presença de BK mais [Leu⁸, des-Arg⁹]-BK (1 μM), Hoe 140 ou NPC 17731 (100 nM de cada), cada qual adicionado ao meio 5 min antes da BK. Testamos, ainda, a influência da [des-Arg⁹]-BK (300 nM) sobre os efeitos induzidos por ATP ou noradrenalina. Somente um agonista contrátil, uma cinina e/ou um antagonista de receptor de cinina foi testado em cada preparação. Ao término de cada experimento o tecido foi colocado em papel filtro e pesado.

3.5- Análise estatística

As alterações induzidas pelos agonistas nas contrações causadas por estimulação elétrica de campo estão expressas como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do aumento ou da diminuição da contração neurogênica (em mg de tensão por 10 mg de tecido úmido), em relação à contração neurogênica basal tomada antes da adição da droga. Os efeitos máximos de potencialização ou de inibição das contrações neurogênicas induzidas pelos agonistas estão simbolizados por $E_{m\acute{a}x}$ e $I_{m\acute{a}x}$, respectivamente. Os valores das CE_{50} e das CI_{50} (concentrações que causaram 50% do efeito potencializador ou de inibição das contrações neurogênicas, respectivamente), foram determinadas em experimentos individuais, a partir das curvas concentração-resposta completas ao agonista na ausência ou na presença de um antagonista. Os valores de CE_{50} e CI_{50} são apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança para 95% (Fleming *et al.*, 1972). Os valores dos pA_2 aparentes são apresentados como média \pm E.P.M. e os coeficientes angulares das regressões lineares do cotejamento gráfico de Schild são apresentados como média acompanhada dos limites de confiança para 95% (Kenakin, 1993). Os resultados obtidos foram analisados, estatisticamente, através da aplicação de análise de variância seguida pelo teste-t de Student pareado ou não-pareado, de acordo com a situação. Diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

3.6- Drogas

O ATP dissódico, bitartarato de noradrenalina, BK, captopril, cloridrato de clonidina, cloridrato de prazosin, $[Hyp^3]$ -BK, $[Leu^8, des-Arg^9]$ -BK, Lys-BK, $[Met, Lys]$ -BK, sarafotoxina S6c, substância P, sulfato de guanetidina,

tetrodotoxina, [Tyr(Me)⁸]-BK, e o α,β -metileno ATP (sal de lítio) foram adquiridas da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). A big-ET-1, ET-1 e ET-3 humana foram adquiridas da Peptide Institute Inc. (Osaka, Japão). A [des-Arg⁹]-BK e o fosforamidon foram obtidos da Peninsula Labs. (Belmont, EUA). 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-metoxicarboniltriptofanil-D-norleucina) foi cedido pela Banyu Pharmaceutical Co. (Tsukuba, Japão). O IRL 1620 (Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-ET-1) foi cedido pela Ciba-Geigy (Tarazuka, Japão). O Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸-BK) e o NPC 17731 (D-Arg-[Hyp³,D-Hyp⁵(transpropil)⁷,Oic⁸]-BK) foram cedidos pela Hoechst A.G. (Frankfurt, Alemanha) e Scios\NOVA (Baltimore, EUA), respectivamente. A maioria das soluções estoque foram preparadas com tampão fosfato, mas aquelas com prazosin e noradrenalina foram preparadas em etanol 100% e HCl 0.1 N, respectivamente. Soluções estoque (10 μ M a 100 mM) foram estocadas à -18°C e diluídas nas concentrações desejadas com tampão fosfato imediatamente antes do uso. O etanol não modificou a tensão basal ou as contrações induzidas por noradrenalina na concentração de 0.01% (concentração final na cuba quando da adição da prazosin).

4- RESULTADOS

4.1- Caracterização das contrações provocadas pela estimulação elétrica de campo

A estimulação elétrica de campo causou, no ducto deferente de camundongo, contrações de 510 ± 10 mg de tensão por 10 mg de tecido úmido ($n = 60$), que foram abolidas por tetrodotoxina (100 nM) ou guanetidina ($5 \mu\text{M}$; $n = 6$ para cada; resultados não mostrados). Ainda, essas contrações foram abolidas após dessensibilização dos purinoceptores P_{2x} induzida por α, β -metileno-ATP ($10 \mu\text{M}$), mas foram inibidas apenas parcialmente (aproximadamente 25%) pelo prazosin (100 nM), um bloqueador de receptores adrenérgicos α_1 ($n = 6$, resultados não mostrados). Tais resultados indicam que as contrações neurogênicas, no ducto deferente de camundongo, foram mediadas pela ativação de motoneurônios simpáticos.

4.2- Resultados com endotelinas

4.2.1- Efeitos dos agonistas endotelinérgicos sobre as contrações neurogênicas

Adições cumulativas de ET-1 (0.01 a 30 nM) induziram potencialização concentração-dependente das contrações neurogênicas induzidas pela estimulação elétrica de campo (Figura 1), fornecendo uma CE_{50} de 0.7 nM (0.4 - 1.6) e um $E_{m\acute{a}x}$ de 473 ± 35 (Tabela 1). Os efeitos da ET-1 tiveram início aproximadamente 30 s após a adição do peptídeo e atingiram um platô dentro de 5 a 10 min, após o qual o efeito permaneceu estável por pelo menos 1 h.

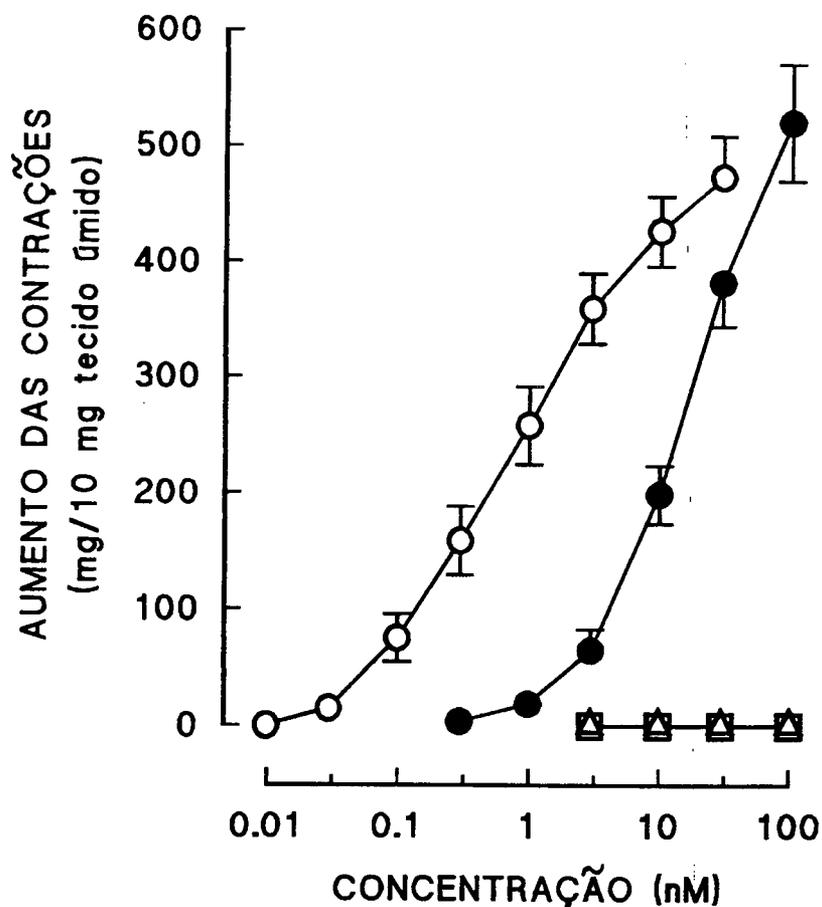


FIGURA 1 - Curvas concentração-resposta médias aos efeitos da endotelina-1 (○), endotelina-3 (●), sarafotoxina S6c (□) e IRL 1620 (△) sobre contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

TABELA 1 - Efeitos de agonistas para receptores de endotelinas sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundogo. As CE_{50} s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. "RCE" indica a razão entre a CE_{50} do agonista e a CE_{50} da endotelina-1, isto é a potência relativa do agonista quando comparada à da endotelina-1. O $E_{máx}$ está expresso como a média \pm E.P.M. e em mg/10 mg tecido).

AGONISTA	CE_{50} nM	RCE	$E_{máx}$	n
Endotelina-1	0.7 (0.4-1.6)	-	473 \pm 35	6
Endotelina-3	13.7 (10.2-14.1)	19.6	520 \pm 51	6
Sarafotoxina S6c	inativo até 100 nM	-	-	4
IRL 1620	inativo até 100 nM	-	-	4
Big-endotelina-1	6.8 (4.7-9.6)	9.7	457 \pm 37	6

Uma potencialização significativa ainda era evidente 2 horas após a retirada do peptídeo (30 nM), mesmo que nesse período a solução nutriente fosse renovada a cada 15 min ($n = 6$, resultados não mostrados). Da mesma forma, a ET-3 também potencializou as contrações neurogênicas, mas foi cerca de 20 vezes menos potente que a ET-1, com uma CE_{50} de 13.7 nM (10.2 - 14.1) e um $E_{máx}$ de 520 ± 51 (Figura 1 e Tabela 1). Em contraste, a sarafotoxina S6c e o IRL 1620, ambos agonistas seletivos de receptores ET_B , não alteraram as contrações neurogênicas em concentrações de até 100 nM (Figura 1 e Tabela 1). Ao contrário, ambos esses compostos (0.1 a 100 nM) causaram contrações concentração-dependentes em tiras de bexiga biliar isoladas de cobaia ($n = 6$, Cardozo *et al.*, 1995 submetido à publicação).

4.2.2- Influência do BQ-123 e do BQ-788 sobre as respostas induzidas por endotelina-1 ou endotelina-3

A pré-incubação com BQ-123, antagonista seletivo para receptores ET_A , não modificou as respostas neurogênicas no ducto deferente *per se* (até 1 μ M), mas deslocou à direita a curva concentração-resposta para o efeito potencializador da ET-1 sobre as contrações neurogênicas. Entretanto, como mostrado na Figura 2, o grau de antagonismo produzido pelo BQ-123 contra esse agonista foi modesto e não mostrou ser proporcional a concentração empregada, já que a CE_{50} da ET-1 foi aumentada em duas, cinco e seis vezes por 0.1, 0.3 e 1 μ M de BQ-123, respectivamente (Tabela 2). Além disso, o BQ-123 (0.3 e 1 μ M) aumentou significativamente o $E_{máx}$ da ET-1 (Figura 2 e Tabela 2). Por outro lado, concentrações menores de BQ-123 (10, 30 e 100 nM) antagonizaram de modo concentração-dependente o efeito potencializador da ET-3 sobre as contrações neurogênicas (Figura 2 e Tabela 2).

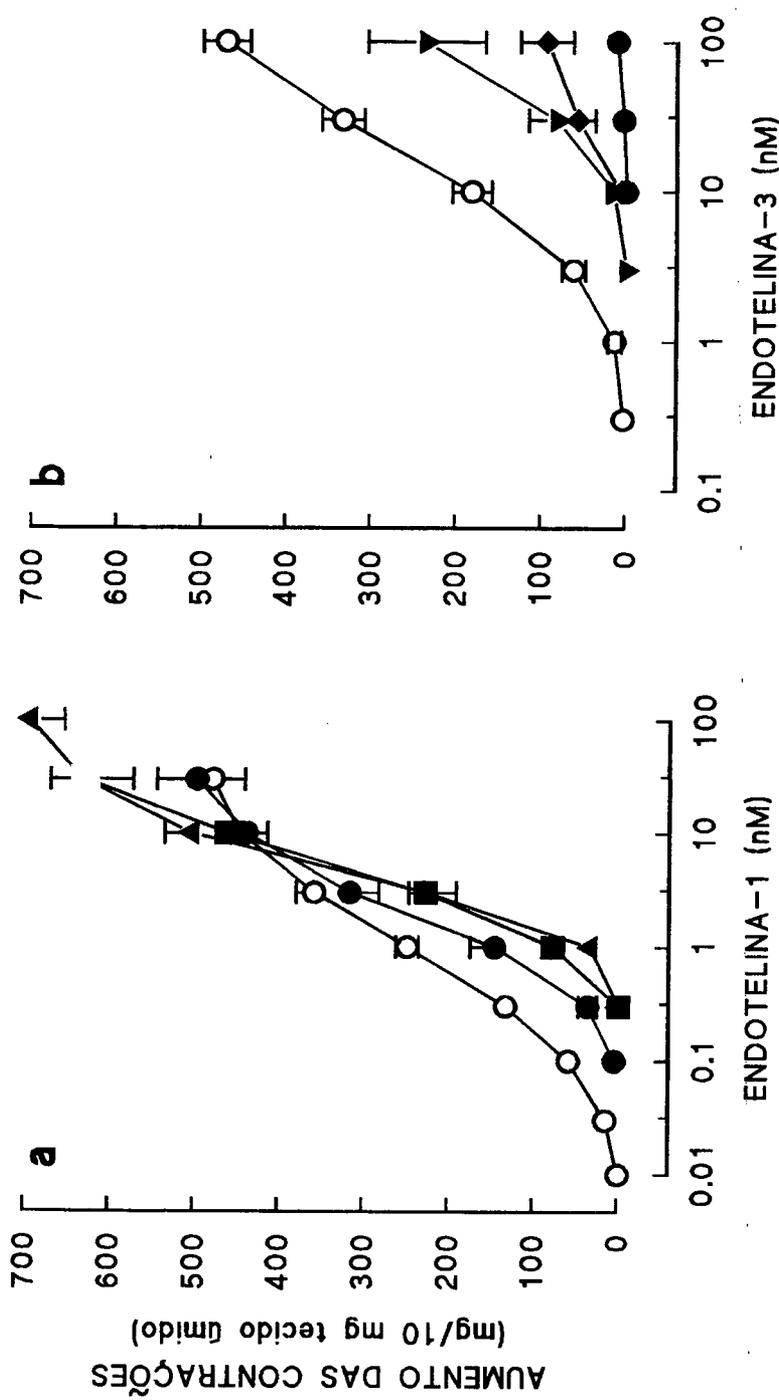


FIGURA 2 - Influência do BQ-123, um antagonista seletivo para receptores de endotelinas do tipo ET A, sobre os efeitos potencializadores da endotelina-1 (painel a) e da endotelina-3 (painel b) nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo induzidas por estimulação elétrica de campo. Os símbolos indicam efeitos produzidos pelos agonistas na ausência (○) ou na presença de BQ-123 10 nM (▼), 30 nM (◆), 100 nM (●), 300 nM (■) ou 1 μM (▲), adicionado ao banho 30 min antes da curva para o agonista. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 a 14 experimentos.

TABELA 2 - Influência do BQ-123 (antagonista seletivo para receptores ET_A) e do BQ-788 (antagonista seletivo para receptores ET_B) nos efeitos da endotelina-1 (ET-1) e da endotelina-3 (ET-3) sobre as contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo. As CE₅₀s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. "RCE" indica a razão entre as CE₅₀s do agonista na presença e ausência do antagonista. O E_{máx} está expresso como a média ± E.P.M. (em mg/10 mg tecido). O termo "n.d." indica valores não determinados. ^a P < 0.05 em relação ao respectivo controle. ^b P < 0.05 em relação à resposta induzida por 100 nM do agonista sozinho. (ANOVA seguido pelo teste t de Student, não pareado).

AGONISTA	CONDIÇÃO	CE50 nM	RCE	E _{máx}	n
ET-1	Controle	0.8 (0.6-1.1)	-	479 ± 38	14
	+ BQ-123 100 nM	1.9 (1.2-3.0) ^a	2.4	498 ± 47	6
	+ BQ-123 300 nM	4.2 (2.7-6.6) ^a	5.2	629 ± 57 ^a	6
	+ BQ-123 1 μM	5.0 (3.9-6.5) ^a	6.2	695 ± 40 ^a	6
ET-1	Controle	0.6 (0.3-1.3)	-	505 ± 51	4
	+ BQ-788 100 nM	0.5 (0.2-1.0)	0.8	552 ± 73	4
ET-3	Controle	14.3 (11.3-18.7)	-	472 ± 28	8
	+ BQ-123 10 nM	n.d.	n.d.	236 ± 69 ^b	4
	+ BQ-123 30 nM	n.d.	n.d.	94 ± 31 ^b	4
	+ BQ-123 100 nM	n.d.	n.d.	10 ± 4 ^b	4
ET-3	Controle	8.5 (6.2-11.8)	-	640 ± 72	5
	+ BQ-788 100 nM	15.8 (11.5-21.9)	1.9	695 ± 51	5

Os efeitos do BQ-123 foram específicos uma vez que, na concentração de 300 nM, essa droga reduziu marcadamente a potencialização (em mg/10 mg de peso de tecido) induzidas por ET-1 (1 nM, de 269 ± 28 para 79 ± 26 , $P < 0.05$, teste "t" de Student pareado) e aboliu àquelas induzidas por ET-3 (10 nM, $P < 0.05$), mas não modificaram as respostas equiefetivas induzidas por substância P (3 nM, de 254 ± 35 para 262 ± 39 ;) ou BK (30 nM, de 202 ± 28 para 234 ± 41 , $n = 5-6$).

O antagonista seletivo para receptores ET_B , BQ-788 (100 nM), não alterou as respostas induzidas pela estimulação de campo *per se*. Além disso, ao contrário do que foi observado com o BQ-123, o BQ-788 não inibiu as potencializações induzidas pela ET-1, embora tenha apresentado um efeito inibitório discreto sobre a resposta induzida por 10 nM de ET-3 (Figura 3). Em contraste, o BQ-788 (10 nM) inibiu em 90 a 100% a liberação de tromboxano A_2 (que é insensível ao BQ-123) induzida por ET-1 ou IRL 1620 no pulmão perfundido de cobaia (D'Orléans-Juste *et al.*, 1994).

4.2.3- Efeitos da big-endotelina-1 sobre as contrações neurogênicas

O precursor imediato da ET-1, big-ET-1 (0.3 a 100 nM), induziu potencializações concentração-dependentes das contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo (Figuras 4 e 5). A latência para o início desse efeito (aproximadamente 10 min) foi maior do que o observado para ET-1. Adicionalmente, considerando a resposta alcançada com 100 nM como sendo o $E_{m\acute{a}x}$ da big-ET-1 (que foi semelhante ao $E_{m\acute{a}x}$ obtido para a ET-1), a CE_{50} do precursor (6.8 nM, 4.7 - 9.6) foi somente 10 vezes maior que a da ET-1 (0.7 nM, 0.4 - 1.6, Tabela 1). A pré-incubação com o inibidor de endopeptidases neutras, fosforamidon (100 μ M; 45 min antes), não afetou as contrações neurogênicas basais ou as respostas à ET-1. Porém, o fosforamidon reduziu significativamente as respostas induzidas por big-ET-1 (Figura 5).

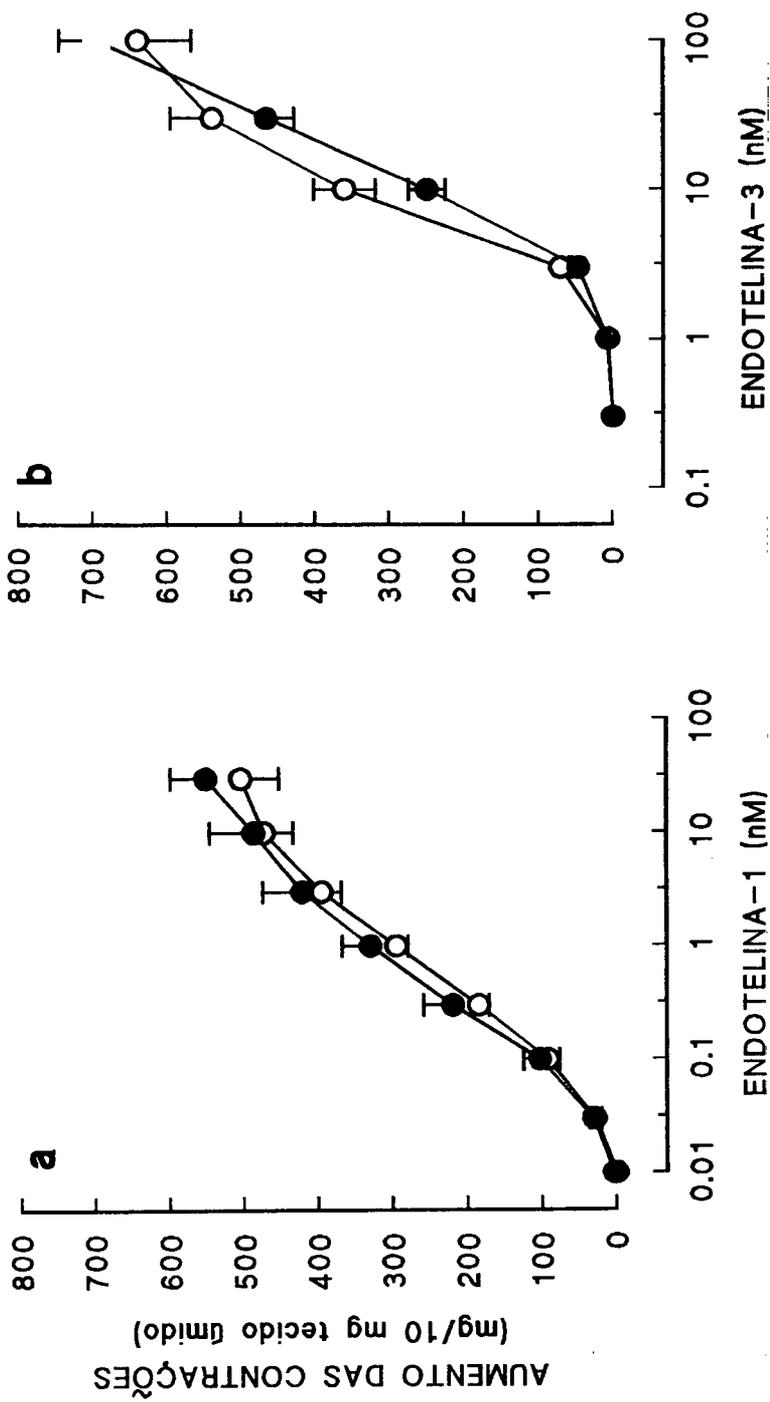


FIGURA 3 - Influência do BQ-788, antagonista seletivo para receptores de endotelinas do tipo ET_{β} , sobre os efeitos da endotelina-1 (painel a) e da endotelina-3 (painel b) sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo. Os pontos indicam efeitos dos agonistas na ausência (○) ou na presença de 100 nM de BQ-788 (●), adicionado ao banho 30 min antes do agonista. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

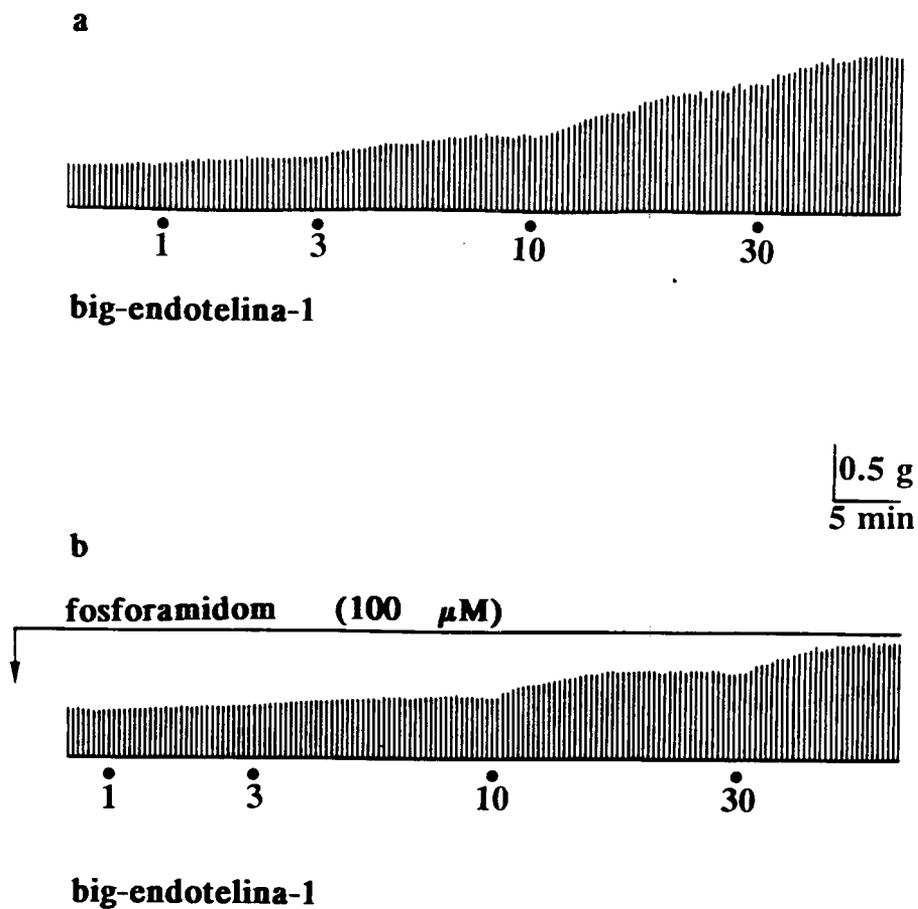


FIGURA 4 - Registros isométricos típicos dos efeitos da big-endotelina-1 sobre as contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo na ausência (a) ou presença de fosforamidom 100 μM (b), adicionado ao banho 45 min antes do peptídeo. Registros semelhantes foram obtidos em outros 4 experimentos.

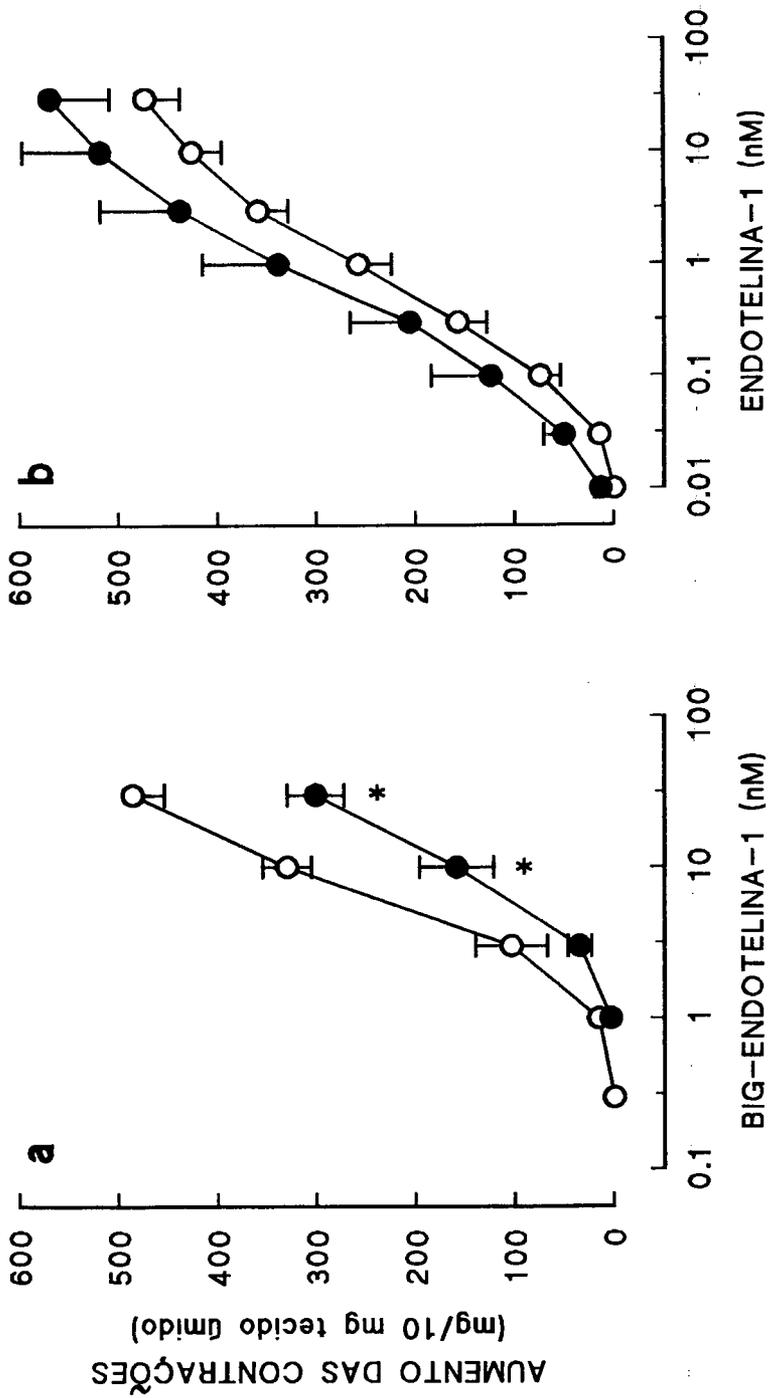


FIGURA 5 - Curvas concentração-resposta médias à big-endothelina-1 (painel a) e à endothelina-1 (painel b) sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo, induzidas por estimulação elétrica de campo, na ausência (O) ou presença de fosforamidon 100 μM (●), adicionado ao banho 45 min antes dos peptídeos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5 a 6 experimentos. Os asteriscos indicam $P < 0.05$ quando comparado com o respectivo valor controle (teste-t de Student pareado).

4.3- Resultados com cininas

4.3.1- Efeitos da bradicinina e peptídeos relacionados sobre as contrações neurogênicas

Concentrações crescentes não-cumulativas de BK (0.1 nM - 3 μ M), na presença de captopril, causaram potencializações concentração-dependentes das contrações induzidas por estimulação elétrica de campo no ducto deferente (Figuras 6 e 7). A CE_{50} da BK na presença de captopril foi de 4.5 nM (1.7 - 11.6) e o $E_{m\acute{a}x}$ de 315 ± 19 mg por 10 mg de tecido úmido (Tabela 3). Além disso, adições repetidas de BK (30 nM), em intervalos de 1 h, induziram respostas reproduzíveis mesmo após 8 hs de equilíbrio ($n = 3$, resultados não mostrados). Em experimentos conduzidos na ausência de captopril, a potência da BK foi reduzida em 9 vezes (CE_{50} de 42.9 nM, 29.2 - 62.8; $E_{m\acute{a}x}$ de 307 ± 32 , $n = 6$). De forma qualitativamente semelhante, foram também observadas potencializações concentração-dependentes das contrações neurogênicas em resposta à Lys-BK, [Hyp³]-BK, [Met,Lys]-BK, e ao agonista seletivo para receptores B_2 , [Tyr(Me)⁸]-BK (0.1 nM a 1 μ M). As CE_{50} e os $E_{m\acute{a}x}$ foram semelhantes aos da BK (Tabela 3).

Ao contrário da BK, o agonista seletivo para receptores B_1 , [des-Arg⁹]-BK (0.3 a 100 nM), causou inibição concentração-dependente das contrações neurogênicas (Figuras 6 e 7). A CI_{50} para o efeito inibitório da [des-Arg⁹]-BK foi de 13.7 nM (10.4 - 16.1) e o $I_{m\acute{a}x}$ de 171 ± 11 (Tabela 3). Em outros experimentos, verificou-se que as respostas induzidas por 300 nM de [des-Arg⁹], a intervalos de 1 h, permaneciam reproduzíveis por um período superior a 8 hs ($n = 4$, resultados não apresentados).

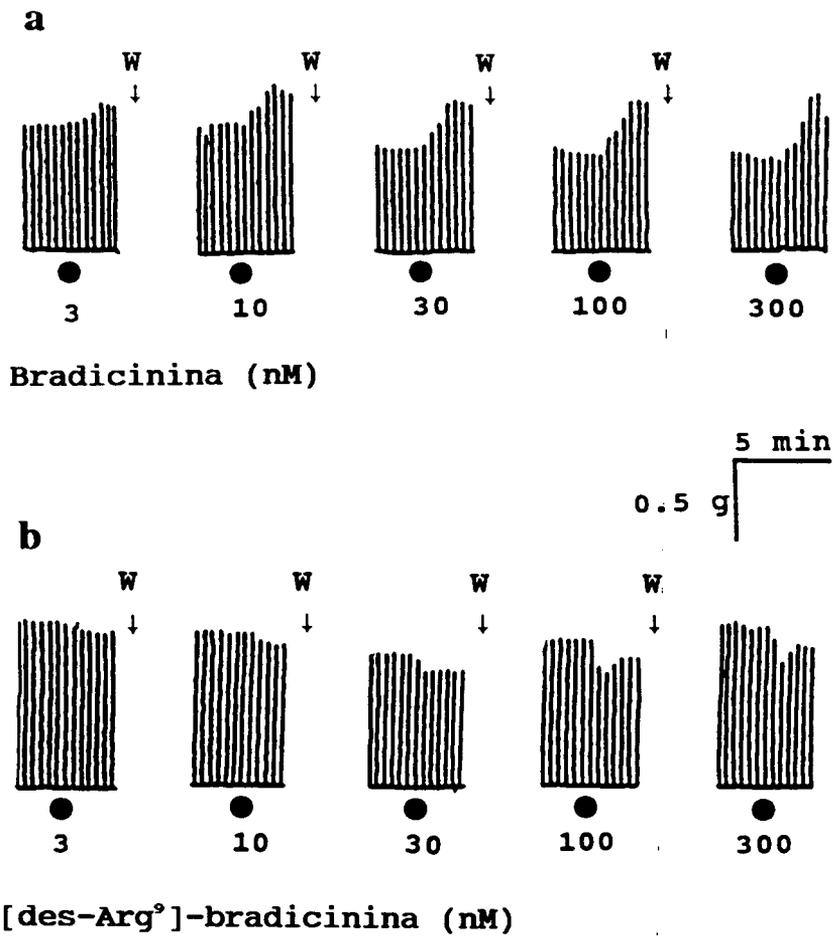


FIGURA 6 - Registros isométricos típicos dos efeitos da bradicinina (**a**) e da [des-Arg⁹]-bradicinina (**b**) sobre as respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo à estimulação elétrica de campo. Os agonistas foram adicionados ao banho (●), nas concentrações indicadas, por 2 min a intervalos de 30 min. W indica renovação da solução fisiológica. Registros semelhantes foram obtidos em outros 3 a 5 experimentos.

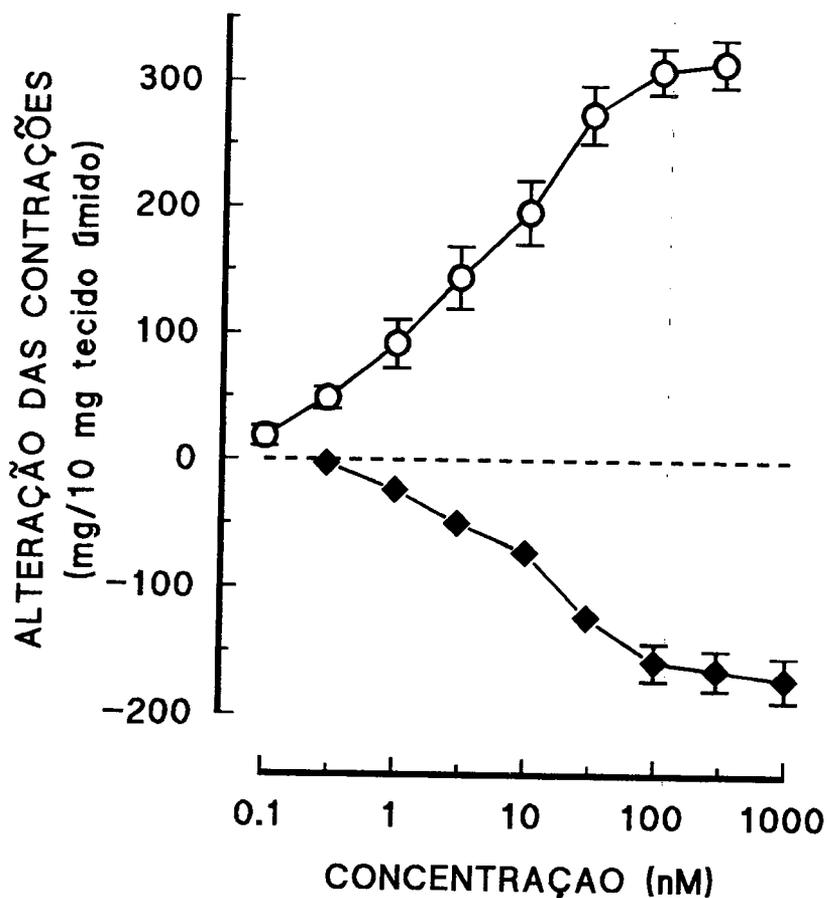


FIGURA 7 - Curvas concentração-resposta médias para os efeitos potencializadores da bradicininina (○) ou inibitórios para a [des-Arg⁹]-bradicininina (◆) sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo à estimulação elétrica de campo. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

TABELA 3 - Efeitos das cininas sobre respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo. As CE_{50} s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O $E_{máx}$ está expresso como a média \pm E.P.M. (em mg/10 mg tecido). ^s CI_{50} para inibição das respostas neurogênicas. ^{ss} $I_{máx}$ para inibição das respostas neurogênicas.

AGONISTA	CONDIÇÃO	CE_{50} nM	$E_{máx}$	n
BK	- Captopril 3 μ M	42.9 (29.2-62.8)	+307 \pm 32	6
	+ Captopril 3 μ M	4.5 (1.7-11.6)	+315 \pm 19	6
Lys-BK	+ Captopril 3 μ M	5.0 (3.3-7.4)	+332 \pm 36	6
[Tyr(Me) ⁶]-BK	+ Captopril 3 μ M	9.5 (5.7-15.7)	+367 \pm 50	6
Met,Lys-BK	+ Captopril 3 μ M	2.1 (1.0-3.1)	+292 \pm 34	6
[Hyp ³]-BK	+ Captopril 3 μ M	2.1 (1.1-3.7)	+268 \pm 29	6
[des-Arg ⁹]-BK	+ Captopril 3 μ M	13.7 (10.4-16.1) ^s	-171 \pm 11 ^{ss}	4

4.3.2- Influência de antagonistas seletivos para receptores B₁ ou B₂ sobre os efeitos da bradicinina ou da [des-Arg⁹]-bradicinina

A pré-incubação com os antagonistas seletivos para receptores B₂, Hoe 140 (1 a 10 nM) ou NPC 17731 (1 a 30 nM), provocou deslocamento à direita, concentração-dependente, da curva de potencialização induzida pela BK sobre as contrações neurogênicas (Figura 8). A aplicação do cotejamento gráfico de Schild a esses resultados originou retas de regressão cujos coeficientes angulares não diferiram significativamente da unidade [Hoe 140 1.1 (0.9 - 1.4); NPC 17731 0.9 (0.8 - 1.1)], permitindo, assim, a determinação de valores aparentes de pA₂ de 9.65 ± 0.09 e 9.08 ± 0.13 para o Hoe 140 e NPC 17731, respectivamente (Figura 8). Os antagonistas usados não apresentaram atividade agonística em concentrações até 300 nM (n = 5; resultados não apresentados). Tanto o Hoe 140 quanto o NPC 17731 (100 nM), em concentrações 10 a 30 vezes maiores que os valores dos pA₂ calculados para esses antagonistas, não alteraram as potencializações induzidas por substância P (3 nM) ou ET-1 (1 nM), mas praticamente aboliram respostas induzidas por concentrações relativamente equiefetivas de BK (300 nM) ou Lys-BK (300 nM) (Figura 9).

Por outro lado, mesmo na concentração de 1 μ M, tanto o Hoe 140 quanto o NPC 17731 não revelaram um possível efeito inibidor da BK sobre as contrações neurogênicas (n = 3; resultados não demonstrados). Em outras palavras, em nossos experimentos, o bloqueio de receptores B₂ não transformou o efeito potencializador da BK em um efeito inibitório sobre as contrações neurogênicas.

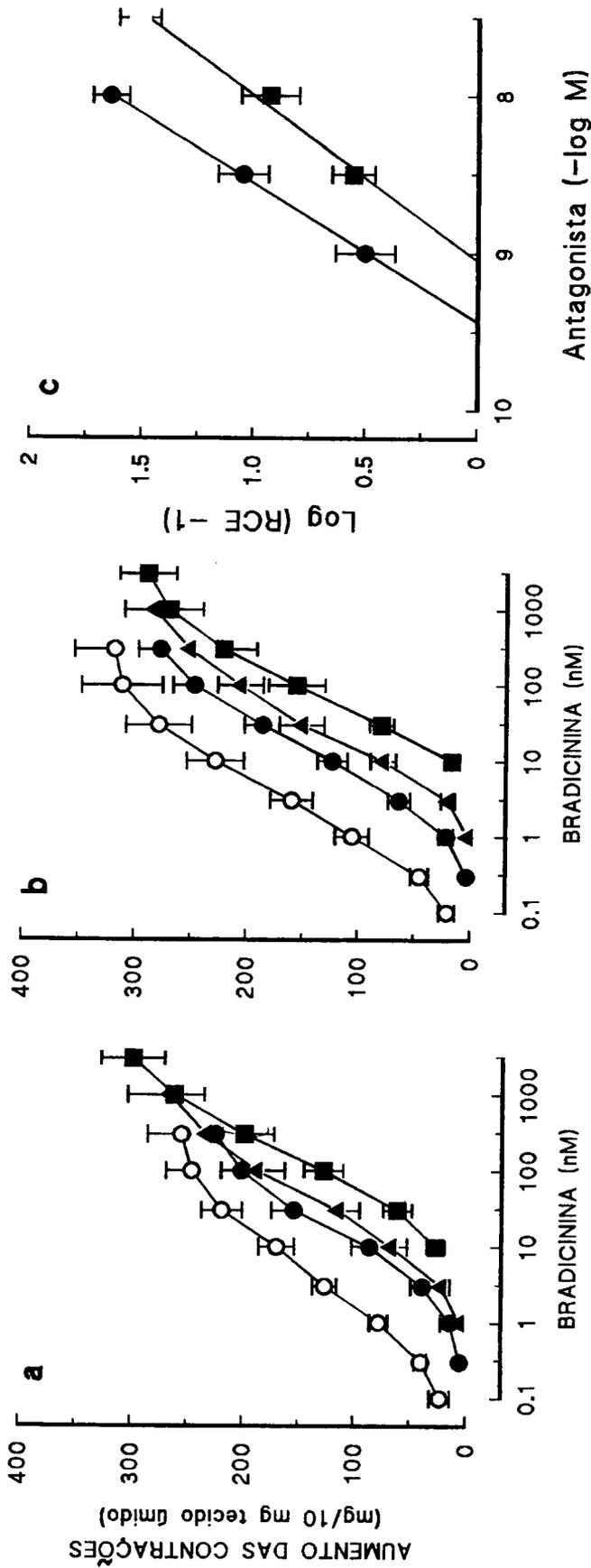


FIGURA 8 - Influência do Hoe 140 e do NPC 17731, antagonistas seletivos para receptores B_2 , sobre os efeitos potencializadores da bradycinina nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo à estimulação elétrica de campo. Curvas concentração-resposta médias para a bradycinina na ausência (○) ou presença de (a) Hoe 140: 1 (●), 3 (▲) ou 10 nM (■), ou de (b) NPC 17731: 3 (●), 10 (▲) ou 30 nM (■). O painel c mostra o cotejamento gráfico de Schild para o bloqueio, pelo Hoe 140 (●) ou NPC 17731 (■), das potencializações induzidas pela bradycinina. "RCE" indica a razão entre as DE_{50} s da bradycinina na presença e ausência de antagonista. Cada valor é a média \pm E.P.M. de 6 experimentos.

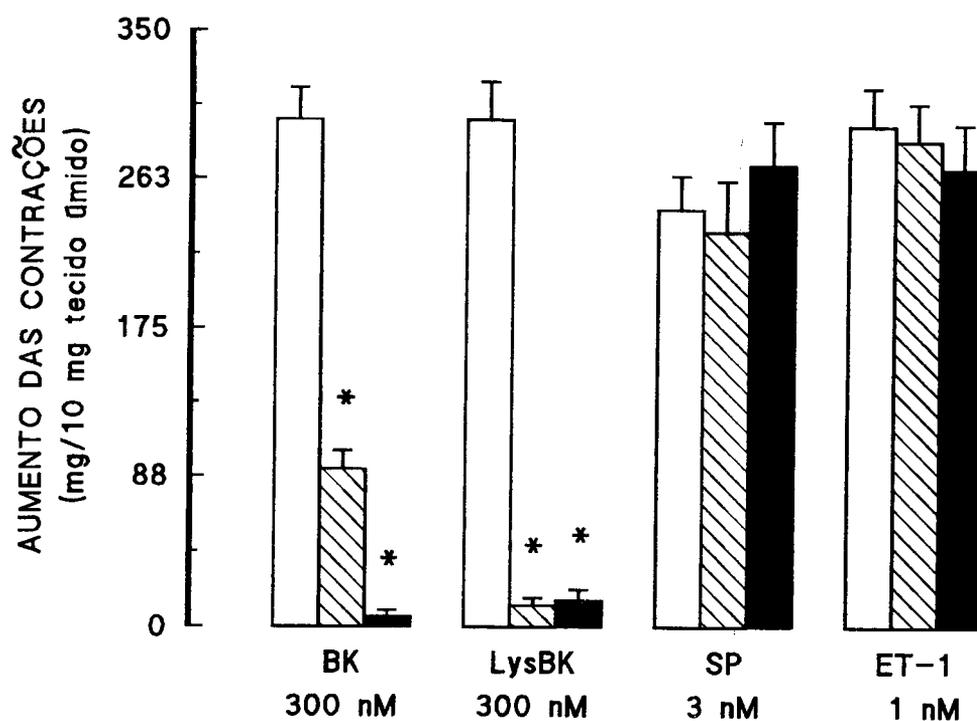


FIGURA 9 - Influência do Hoe 140 (100 nM) e do NPC 17731 (100 nM), antagonistas seletivos para receptores B_2 , sobre as potencializações das respostas neurogênicas induzidas pela bradicinina (BK), Lys-bradicinina (Lys-BK), substância P (SP) e endotelina-1 (ET-1) no ducto deferente de camundongo. Os valores representam as respostas ao agonista na ausência (coluna aberta) ou na presença de Hoe 140 (coluna hachurada) ou NPC 17731 (coluna fechada). Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6 experimentos.

Como demonstrado na Figura 10, o antagonista de receptores B_1 [$\text{Leu}^8, \text{des-Arg}^9$]-BK ($1 \mu\text{M}$), aumentou significativamente os efeitos potencializadores de concentrações maiores de BK (30 a 300 nM) sobre as contrações neurogênicas. Além disso, o [$\text{Leu}^8, \text{des-Arg}^9$]-BK ($1 \mu\text{M}$) aboliu o efeito inibitório da [des-Arg^9]-BK (300 nM) sobre as contrações neurogênicas (Figura 11), sem modificar inibições semelhantes induzidas por clonidina (1 nM) ou morfina (300 nM) (Figura 12). Por outro lado, o efeito inibitório induzido pela [des-Arg^9]-BK (300 nM) não foi alterado pela presença de Hoe 140 (30 nM) ou NPC 17731 (100 nM) (Figura 11).

4.3.3- Efeitos da bradicinina e [des-Arg^9]-bradicinina sobre contrações induzidas por ATP e noradrenalina

Em preparações não estimuladas eletricamente, a BK (100 nM) potencializou as contrações provocadas pelo ATP ($100 \mu\text{M}$), mas não alterou as contrações, de magnitude semelhante, induzidas por noradrenalina ($10 \mu\text{M}$, Figuras 13 e 14). O efeito potencializador da BK, sobre as contrações induzidas por ATP, foi abolido pela pré-incubação com os antagonistas seletivos para receptores B_2 Hoe 140 (10 nM) ou NPC 17731 (30 nM). Ao contrário, o antagonista seletivo para receptores B_1 [$\text{Leu}^8, \text{des-Arg}^9$]-BK ($1 \mu\text{M}$, $n = 3$) não alterou esse efeito da BK (Figuras 13 e 14). Em contraste com os efeitos da BK, o agonista seletivo de receptor B_1 , [des-Arg^9]-BK, não foi capaz de alterar as contrações induzidas pelo ATP ou pela noradrenalina (Figuras 13 e 14).

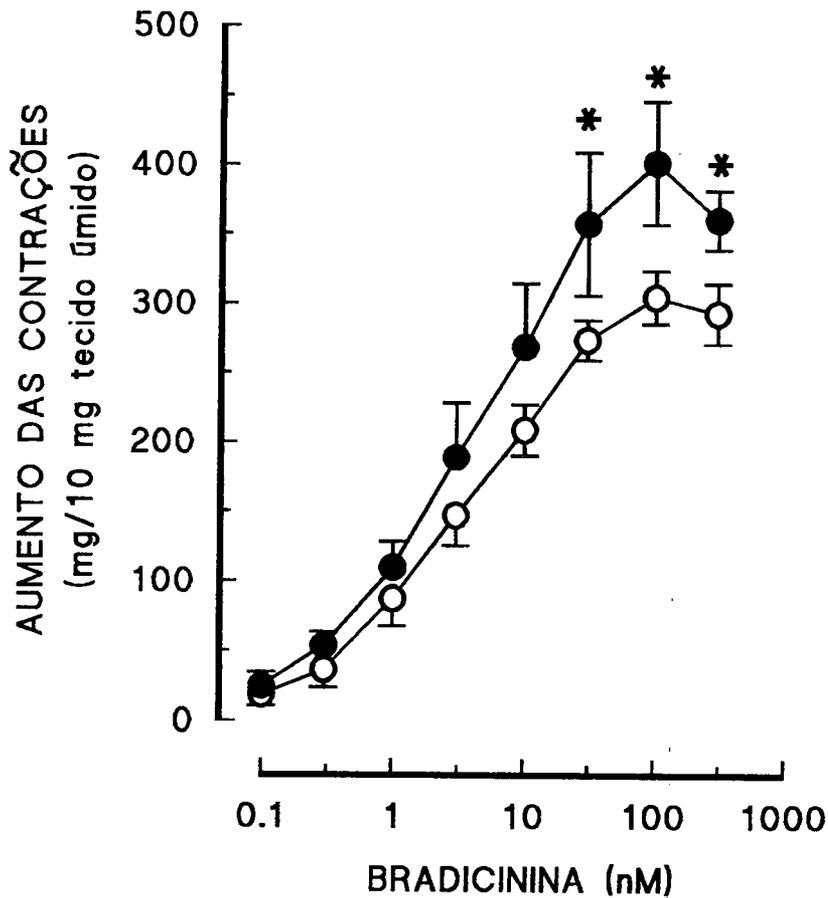


FIGURA 10 - Curvas concentração-resposta médias ao efeito potencializador da bradicinina sobre as respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo à estimulação elétrica de campo, na ausência (○) ou presença (●) do antagonista seletivo de receptor B_1 [Leu⁸,des-Arg⁹]-bradicinina (1 μ M, adicionado 5 min antes de cada adição de agonista). Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5 experimentos. Os asteriscos indicam $P < 0.05$ (ANOVA seguido pelo teste-*t* de Student) quando comparados aos respectivos controles.

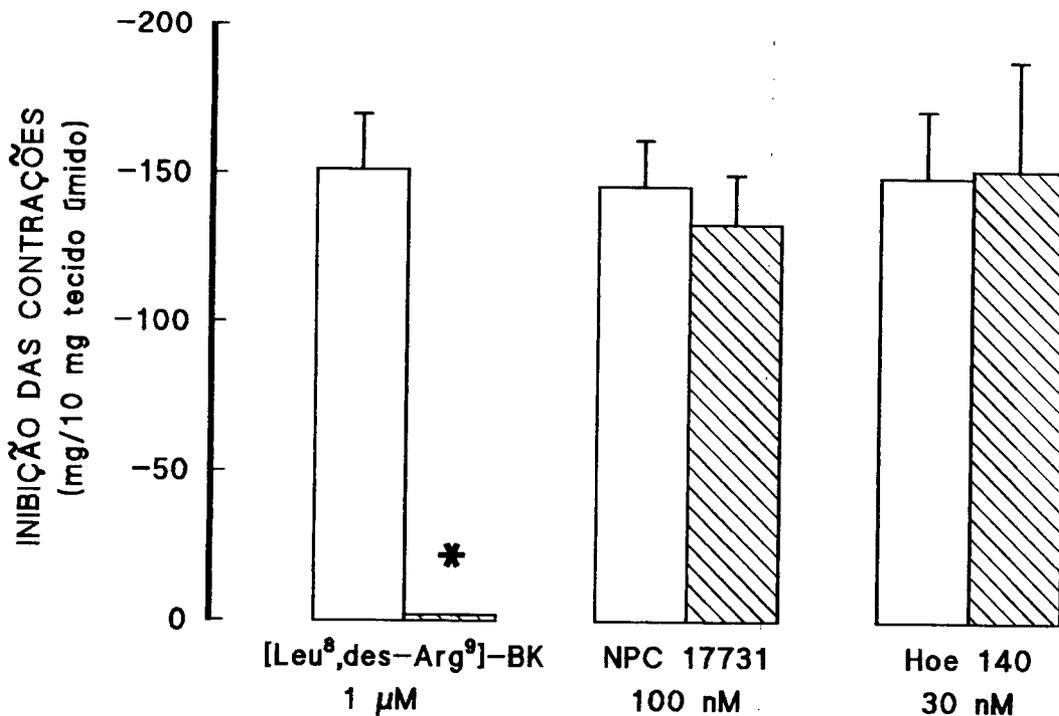


FIGURA 11 - Efeitos do agonista seletivo de receptor B₁ [des-Arg⁹]-bradicinina (300 nM), nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo à estimulação elétrica de campo, na ausência (colunas abertas) ou na presença (colunas hachuradas) do antagonista de receptor B₁ [leu⁸,des-Arg⁹]-bradicinina ou B₂ Hoe 140 e NPC 17731, adicionados ao banho 5 min antes do agonista. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5 experimentos. Asterisco indica P < 0.001 (ANOVA seguido pelo teste-t de Student) quando comparados aos respectivos controles.

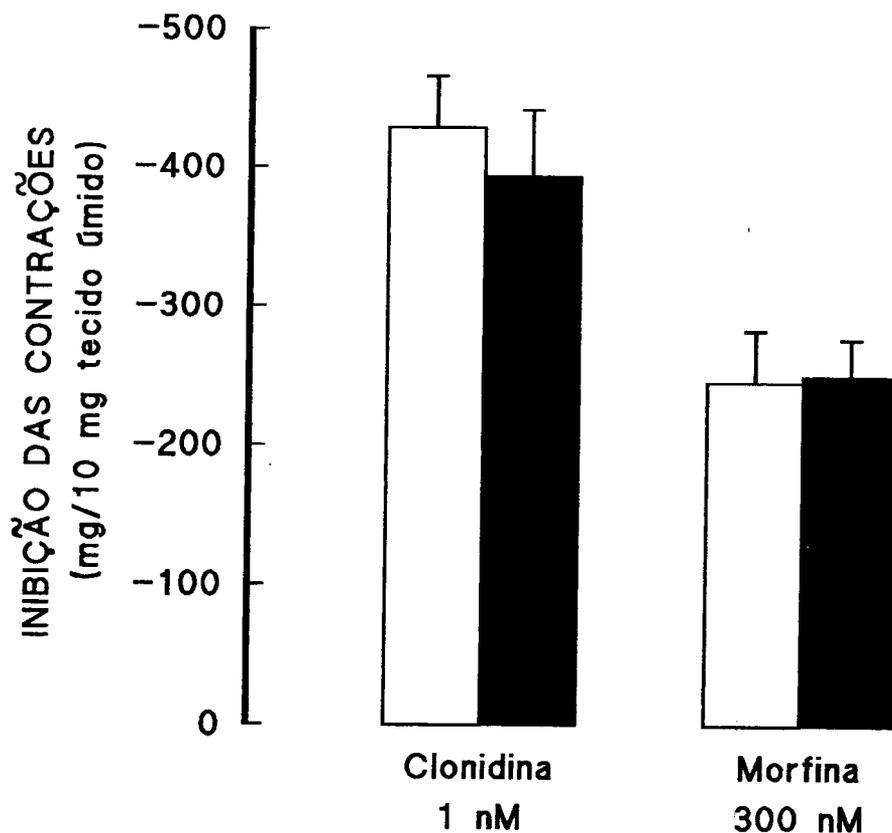


FIGURA 12 - Influência do antagonista seletivo de receptor B_1 [Leu⁸,des-Arg⁹]-bradicinina sobre os efeitos inibitórios da clonidina (1 nM) ou morfina (300 nM) nas respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo à estimulação elétrica de campo. Valores representam respostas ao agonista na ausência (colunas abertas) ou na presença (colunas fechadas) do antagonista, adicionado ao banho 5 min antes do agonista. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 3 a 4 experimentos.

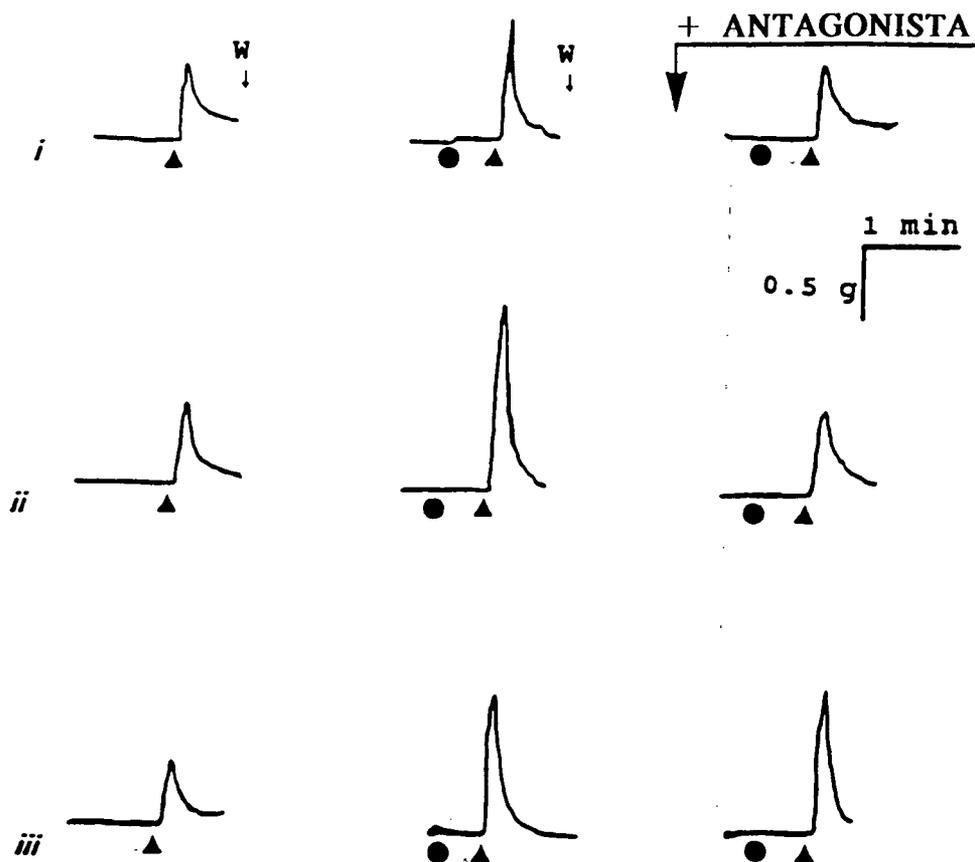


FIGURA 13 - Registros isométricos típicos dos efeitos induzidos por ATP ($100 \mu\text{M}$; ▲) no ducto deferente isolado de camundongo na ausência ou na presença de bradycininina (100 nM , adicionado 30-45 s antes; ●), e na presença de bradycininina mais Hoe 140 (10 nM ; *i*), NPC 17731 (30 nM ; *ii*) ou [$\text{leu}^8, \text{des-Arg}^9$]-bradycininina ($1 \mu\text{M}$; *iii*). Os antagonistas foram adicionados ao banho 5 min antes da bradycininina. "W" indica lavagem da preparação. Resultados semelhantes foram obtidos em mais 2 experimentos.

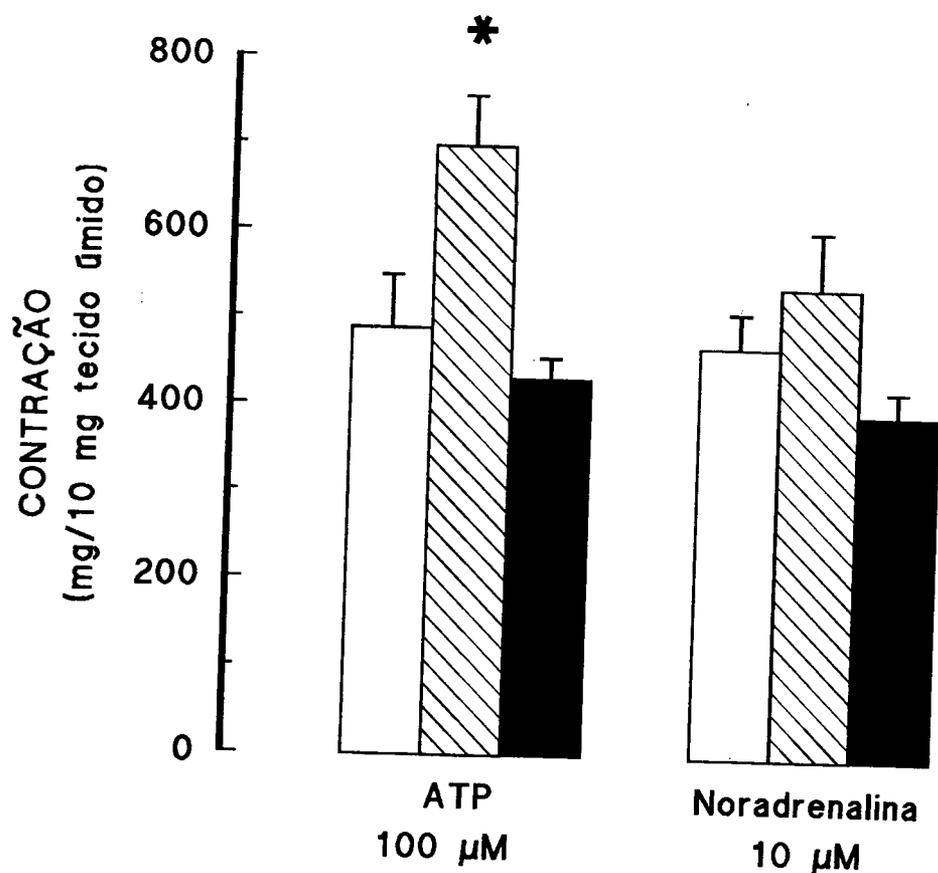


FIGURA 14 - Contrações induzidas por ATP (100 μM) ou noradrenalina (10 μM) no ducto deferente isolado de camundongo na ausência (colunas abertas) ou presença de bradycinin (100 nM; colunas hachuradas) ou [des-Arg⁹]-bradycinin (300 nM). Cada valor é a média \pm E.P.M. de 4 a 7 experimentos. O asterisco indica $P < 0.05$ quando comparado ao respectivo controle (ANOVA seguido de teste- t de Student).

5 - DISCUSSÃO

5.1- Endotelina

Os presentes resultados confirmam os achados de Rae e Calixto (1990), de que as ETs aumentam de forma pronunciada a neurotransmissão simpática no ducto deferente de camundongo. Tal efeito se deve, ao menos em parte, à ativação de receptores para ETs em nível pós-juncional, que resulta na ativação de canais de cálcio do tipo L sensíveis ao bloqueio pela nicardipina (Rae e Calixto, 1990). Complementando aqueles achados, nossos resultados constituem fortes evidências de que esse efeito ocorre em parte pela ativação de uma população de receptores ET_A atípica. Também apresentamos evidências funcionais para a presença de atividade pronunciada da enzima conversora de ET nesse tecido.

Como a ET-1 foi marcadamente (20 vezes) mais potente que a ET-3 na potencialização de contrações neurogênicas no ducto deferente de camundongo, e os agonistas seletivos de receptores ET_B , sarafotoxina S6c e IRL 1620 foram completamente inativos acima de 100 nM, esses resultados poderiam sugerir que os efeitos de ET-1 e ET-3 seriam mediados através de receptores do tipo ET_A (Sakamoto *et al.*, 1993; para revisão ver Huggins *et al.*, 1993). Essa consideração é reforçada pelo fato de que o novo e potente antagonista ET_B -seletivo, o BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1994), falhou em antagonizar as respostas da preparação à ET-1 e reduziu as respostas à ET-3 de forma muito discreta. Apesar de ser uma droga recente, o BQ-788 teve sua seletividade testada, sendo capaz de reduzir em aproximadamente 90% a liberação de tromboxano A_2 induzida pela ET-1 ou IRL 1620 em pulmão perfundido de cobaia, efeito esse insensível ao bloqueio pelo BQ-123 (D'Orléans-Juste *et al.*, 1994), confirmando a presença de receptores ET_B essa preparação.

Adicionalmente, o BQ-123, um antagonista seletivo para receptores ET_A , que na concentração de 300 nM não modificou os aumentos nas contrações neurogênicas induzidas por BK ou substância P, deslocou significativamente a curva para ET-1 à direita. Contudo, esse efeito foi muito discreto e não claramente concentração-dependente. A 0.6 μ M, o BQ-123 aumenta a CE_{50} para contrações induzidas pela ET-1 no útero de rato, uma preparação onde predominam receptores ET_A , em cerca de 30 vezes (Rae *et al.*, 1993); no entanto, a 1 μ M, aumentou a CE_{50} para o agonista no ducto deferente de camundongo em apenas 6 vezes, assim como elevou seu $E_{máx}$. Convém destacar que as potencializações das contrações neurogênicas induzidas pela ET-3 foram bastante sensíveis à inibição pelo BQ-123. A curva à ET-3 foi deslocada à direita por apenas 10 nM de BQ-123, e as respostas do agonista até 100 nM foram praticamente abolidas por 100 nM do antagonista. Infelizmente, a baixa potência da ET-3, aliada ao nosso suprimento limitado do peptídeo, impediram uma caracterização do tipo de antagonismo produzido pelo BQ-123 contra esse agonista.

No ducto deferente de rato, onde a ET-2 e a ET-3 são aproximadamente equipotentes em aumentar as contrações neurogênicas (Télémaque e D'Orléans-Juste, 1991), o BQ-123 também antagoniza as potencializações induzidas pela ET-3 de modo muito mais pronunciado que aquelas induzidas por ET-1 (Eglezos *et al.*, 1993; Warner *et al.*, 1993a). Para explicar seus resultados, Eglezos *et al.* (1993) sugeriram que as ETs ativam um receptor atípico no ducto deferente de rato, ao passo que Warner *et al.* (1993b) propuseram que os efeitos da ET-1 e ET-3 (e da sarafotoxina S6b) poderiam ser mediados pela ativação de múltiplos receptores que não são do tipo ET_B e, ao mesmo tempo, são diferentes daqueles receptores ET_A presentes na aorta de rato. De modo análogo, os resultados do presente estudo

poderiam sugerir que os receptores para ETs no ducto deferente de camundongo não apresentam um perfil típico de receptores dos tipos ET_A ou ET_B.

À luz da teoria clássica dos receptores, o fato de um único antagonista, no nosso caso o BQ-123, afetar diferentemente respostas semelhantes a dois agonistas estreitamente relacionados, no nosso caso a ET-1 e a ET-3, constituiria evidência funcional para a heterogeneidade de receptores nos canais deferentes de rato e camundongo. Por outro lado, tem sido mostrado que os agonistas e antagonistas ligam-se a distintos domínios do receptor taquicinérgico NK₁ (Fong *et al.*, 1993; Gether *et al.*, 1993a) ou do receptor para colecistocina/gastrina CCK_B (Beinborn *et al.*, 1993). Além disso, diferentes agonistas taquicinérgicos podem também se ligar, em graus variados, a vários domínios estruturais dos receptores NK₁ (Gether *et al.*, 1993b). Esse conjunto de resultados pode refletir, inclusive, um perfil comum à interação de peptídeos com seus receptores, uma vez que situação semelhante também ocorre com os receptores para cininas (Hall, 1992). Talvez um fator determinante das diferenças entre o antagonismo competitivo de efeitos mediados por neurotransmissores clássicos e aquele verificado contra mediadores peptídicos deva-se ao maior tamanho desses últimos, o que proporciona uma interação muito mais extensa e complexa com seus receptores do que a verificada para os neurotransmissores clássicos.

Com relação às ETs em particular, Sakamoto *et al.* (1993) demonstraram que certas modificações estruturais do receptor ET_A podem diminuir, marcadamente, a sua afinidade pelo BQ-123, sem afetar aquela à ET-1 ou à ET-3. Propuseram, ainda, que certos requisitos estruturais obrigatórios para que ocorra interação de alta afinidade com o receptor ET_A, estão ausentes na ET-3. Por outro lado, Lee *et al.* (1994) observaram que um receptor quimérico do tipo ET_A humano, no qual os

domínios transmembrana 4 a 6 e parte do 7 foram substituídos pela estrutura correspondente do receptor ET_B humano, apresentava um aumento de afinidade por agonistas seletivos ET_B bem maior do que o decréscimo de afinidade pelo antagonista ET_A BQ-123. Esses achados revelam que, devido à existência de múltiplos e distintos sítios de ligação de agonistas e antagonistas a receptores para peptídeos, é possível construir-se quimeras capazes de reter alta afinidade por um agonista seletivo, em detrimento de uma perda de afinidade por um antagonista seletivo e vice-versa. Em vista do exposto acima, talvez as diferentes susceptibilidades de respostas geradas pela ET-1 e ET-3 bem como o antagonismo diferenciado pelo BQ-123, no ducto deferente de camundongo e de rato, reflitam ligações desses agonistas a diferentes domínios estruturais de um único tipo de receptor.

Por outro lado, a exemplo do que observamos no ducto deferente de camundongo, Sudjarwo *et al.* (1993;1994) também detectaram, na veia safena isolada de coelho, diferenças pronunciadas nas atividades contráteis da ET-1, ET-3 e dos agonistas seletivos de receptores ET_B , sarafotoxina S6c e IRL 1620. Além disso, as ações desses agonistas apresentaram susceptibilidades distintas de antagonismo por BQ-123 (antagonista seletivo de receptores ET_A) e RES-701-1 (antagonista seletivo de receptores ET_B). O BQ-123 foi mais potente em bloquear os efeitos da ET-3 do que os da ET-1, enquanto o RES-701-1 foi mais potente em inibir os efeitos do IRL 1620 do que os da sarafotoxina S6c. Para explicar esses achados, Sudjarwo *et al.* (1994) propuseram a ocorrência, na veia safena de coelho, de dois subtipos de receptores ET_A (ET_{A1} e ET_{A2}) e ET_B (ET_{B1} e ET_{B2}). O receptor de subtipo ET_{A1} exibiria maior afinidade pela ET-1 do que a ET-3 e alta afinidade pelo BQ-123. Em contraste, o subtipo ET_{A2} apresentaria afinidade alta pela ET-1, mas não

interagiria com ET-3 ou BQ-123. Por sua vez, o receptor de subtipo ET_{B1} teria afinidade alta pela sarafotoxina S6c, IRL 1620 e RES-701-1, enquanto que o subtipo ET_{B2} apresentaria maior afinidade pela sarafotoxina S6c do que pelo IRL 1620, e não interagiria com o RES-701-1 (figura 15a). Essa hipótese poderia ser aplicada, em parte, para explicar porque o BQ-123 antagoniza mais fortemente as ações da ET-3 do que as da ET-1 no ducto deferente de camundongo. Se essa preparação expressa, simultaneamente, receptores dos subtipos ET_{A1} e ET_{A2} , a ET-1 interagiria com receptores ET_{A1} e ET_{A2} , enquanto que a ET-3 interagiria apenas com o subtipo ET_{A1} sensível ao BQ-123.

Não é possível, a partir dos resultados acumulados até o momento, discernir entre a hipótese pela qual a influência distinta do BQ-123 contra respostas mediadas pela ET-1 e a ET-3 no ducto deferente de camundongo reflete heterogeneidade de receptores (i.e., a presença de subtipos ET_{A1} e ET_{A2}) ou deriva de interações distintas dos agonistas e/ou antagonista com um único tipo de receptor. Porém, a potência maior do BQ-123 contra respostas induzidas por ET-3 no ducto deferente de camundongo, quando comparada àquela verificada no ducto deferente de rato (Eglezos *et al.*, 1993), assim como a grande diferença entre as potências de ambas as ETs nas espécies precedentes, podem refletir uma variação interespecies na estrutura de um mesmo tipo de receptor para ET.

A big-ET-1 é 50 a 150 vezes menos potente que a ET-1 na constrição de vasos sanguíneos sem endotélio (Kimura *et al.*, 1989; Nakajima *et al.*, 1989) e 100 vezes menos potente em deslocar ET-1 marcada de membranas de músculo liso vascular (Hirata *et al.*, 1990). Em contraste, observamos que a big-ET-1 foi somente 10 vezes menos potente que a ET-1 na potencialização das contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo, sugerindo que esse tecido

apresenta uma atividade pronunciada de enzima conversora de ET. O fato de fosforamidon, um inibidor de endopeptidases neutras, ter prevenido parcialmente respostas ao precursor imediato, sem afetar significativamente aquelas à ET-1, reforça nossas evidências nesse sentido.

A atividade de enzima conversora de ET, sensível ao fosforamidon, está também presente no ducto deferente de rato, onde a big-ET-1 e a big-ET-2 são somente duas vezes menos potentes que seus respectivos metabólitos ativos (Télémaque e D'Orléans-Juste, 1991; Mattera *et al.*, 1993). No entanto, na mesma preparação, a big-ET-3 ou é inativa (Télémaque e D'Orléans-Juste, 1991) ou é 20 vezes menos potente que ET-3 na potencialização de contrações neurogênicas e, diferentemente da big-ET-1, é inibida tanto por fosforamidon quanto por tiorfan (Mattera *et al.*, 1993). Talvez a discrepância entre ambos os estudos, no que se refere à atividade da big-ET-3, possa ser atribuída ao uso de transdutores de força isotônica por Mattera *et al.* (1993), o que tornou as preparações cerca de 10 vezes mais sensíveis às ETs, quando os resultados são comparados aos obtidos por Télémaque e D'Orléans-Juste (1991), usando transdutores de força isométrica. Uma enzima conversora de ET sensível ao bloqueio por fosforamidon, mas não pelo tiorfan, foi recentemente clonada do DNA de célula endotelial bovina (Shimada *et al.*, 1994). Essa enzima cliva a big-ET-1, mas não big-ET-2 ou big-ET-3, exibindo, portanto, seletividade de ação. Estudos adicionais são necessários para determinar se essa enzima conversora de ET é semelhante àquela responsável pela conversão da big-ET-1 no ducto deferente de camundongo, e se esse tecido pode também processar tanto a big-ET-2 como a big-ET-3.

Embora, pelo que saibamos, ainda não existam estudos demonstrando a síntese de ETs endógenas pelo ducto deferente, altos níveis de ET-1 imunorreativa

têm sido detectados no trato genital masculino, particularmente nos testículos (Matsumoto *et al.*, 1989), no fluido seminal (Casey *et al.*, 1992; Hammami *et al.*, 1994), na próstata (Langenströer *et al.*, 1993), e no corpo cavernoso (Holmquist *et al.*, 1992; para revisão de ETs no trato urogenital ver Rae *et al.*, 1995). Os resultados do presente estudo mostram que o ducto deferente de camundongo expressa forte atividade conversora de ET, e que as ETs exógenas produzem potencialização sustentada das contrações eliciadas por estimulação dos nervos simpáticos. Pode-se sugerir, com base no conjunto dos resultados aqui relatados, que as ETs endógenas podem desempenhar papéis importantes no controle da motilidade do ducto deferente e, conseqüentemente, na transferência do fluido espermático para a próstata.

4.2- Bradicinina

Os resultados do presente estudo demonstram que a BK e peptídeos relacionados a ela podem modular a neurotransmissão simpática no ducto deferente de camundongo de modos distintos, dependendo da seletividade do agonista pelos receptores B_1 e B_2 . Assim, a BK, Lys-BK, [Hyp³]-BK, [Met,Lys]-BK e o agonista seletivo de receptores B_2 , [Tyr(Me)⁸]-BK, causaram potencialização das respostas neurogênicas, com potências comparáveis àquelas encontradas em outros tecidos conhecidos por expressarem receptores B_2 , como o íleo de cobaia e a veia jugular de coelho (para revisão ver Regoli *et al.*, 1993). Por outro lado, o agonista seletivo para receptor B_1 , [des-Arg⁹]-BK, que é inativo no ducto deferente de rato (Llona *et al.*, 1987; Asghar *et al.*, 1993), causou uma inibição das respostas neurogênicas do ducto deferente de camundongo. Outra diferença entre as duas espécies refere-se à ação contrátil direta da BK, que é virtualmente inexistente

no ducto deferente de camundongo, mas pronunciada no de rato, particularmente na sua porção epididimal (Huidobro-Toro *et al.*, 1986; Rifo *et al.*, 1987; Llona *et al.*, 1987; Donoso e Huidobro-Toro, 1989; Asghar *et al.*, 1993).

A possibilidade da BK potencializar as respostas neurogênicas através da ativação de receptores B_2 é substanciada pelos resultados demonstrando que tanto o Hoe 140 quanto o NPC 17731, dois antagonistas seletivos e altamente potentes para receptores B_2 (Hock *et al.*, 1991; Lembeck *et al.*, 1991; Kyle e Burch, 1992, 1993; Burch *et al.*, 1993; Corrêa e Calixto, 1993), induziram deslocamentos à direita na curva de potencialização induzida pela BK, sem modificarem o $E_{máx}$ do agonista. Além disso, as retas de regressão obtidas pelo cotejamento gráfico de Schild apresentaram coeficientes angulares não estatisticamente diferentes da unidade, sugerindo que a BK e ambos os antagonistas estavam interagindo com uma população homogênea de receptores. Sugere, ainda, que o Hoe 140 e o NPC 17731 agem de forma puramente competitiva (Kenakin, 1993). O bloqueio de receptores B_2 pelo Hoe 140 e pelo NPC 17731 em alguns tecidos é caracterizado por um deslocamento à direita da curva concentração-resposta à BK, aliado a uma marcante depressão do $E_{máx}$ (Rhaleb *et al.*, 1992; Griesbacher e Lembeck, 1992; Field *et al.*, 1992; Trifilieff *et al.*, 1993). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de o Hoe 140 e o NPC 17731 não apresentarem qualquer atividade agonística no ducto deferente de camundongo. Alternativamente, isso pode ser devido às diferenças nos tempos de incubação dos antagonistas. As ações do Hoe 140 e do NPC 17731 contra as respostas à BK (e à Lys-BK) foram claramente específicas uma vez que, em concentrações 100 a 300 vezes maiores que seus respectivos valores de K_B aparentes para receptores B_2 , esses antagonistas peptídicos não afetaram potencializações semelhantes induzidas pela ET-1 ou substância P, que ativam

receptores distintos.

Pelo que pudemos inferir, o presente estudo é o primeiro a caracterizar, com sucesso, os receptores B_2 funcionais num tecido de camundongo empregando antagonistas altamente seletivos. O valor de pA_2 aparente para o Hoe 140 (9.65) contra a potencialização induzida por BK no ducto deferente de camundongo é 10 vezes maior que o encontrado num estudo análogo no ducto deferente de rato (Asghar *et al.*, 1993), mas está na mesma ordem de potência encontrada em outros tecidos que expressam receptores B_2 , incluindo íleo de cobaia e humano, veia jugular de coelho, bexiga urinária humana e de hamster e *taenia caeci* de cobaia (Hock *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1991; Field *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1993; Rhaleb *et al.*, 1992; Griesbacher e Lembeck, 1992; Medeiros e Calixto, 1993). O mesmo se aplica ao valor de pA_2 aparente que obtivemos para o NPC 17731 (9.08), que é semelhante ao encontrado no íleo de cobaia (Kyle e Burch, 1992).

Recentemente Hess *et al.* (1994) relataram que receptores B_2 clonados de ratos e humanos, expressos em células ovarianas de hamster chinês, partilham os mesmos mecanismos de acoplamento e exibem afinidades semelhantes por agonistas de receptores B_2 , ainda que difiram marcadamente em suas afinidades por antagonistas de receptores B_2 . Os autores concluíram que, apesar de apresentarem diferenças pronunciadas nas afinidades por antagonistas, ambas as espécies expressam um único receptor B_2 . Em outras palavras, as afinidades diferentes pelos antagonistas são possivelmente devidas às diferenças estruturais interespecies, conforme tem sido demonstrado para outros tipos de receptores (Hall, 1992).

O receptor de cinina mediando o efeito depressor da [des-Arg⁹]-BK sobre as contrações neurogênicas do ducto deferente de camundongo é do tipo B_1 , já que

esse efeito foi resistente ao bloqueio por Hoe 140 e NPC 17731, mas foi inibido pelo antagonista seletivo de receptores B_1 , [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK. A ação da [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK foi específica, uma vez que a droga não influenciou as depressões semelhantes induzidas por clonidina ou morfina. Infelizmente, não foi possível determinar o valor de pA_2 aparente para esse efeito do [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK, em função do achatamento da resposta inibitória máxima induzida pela [des-Arg⁹]-BK. O fato de a [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK ter aumentado de forma discreta, porém significativa, as potencializações das contrações neurogênicas causadas apenas por concentrações altas de BK sugere que os receptores B_1 inibitórios, presentes no ducto deferente de camundongo, apresentam baixa afinidade pela BK. Além disso, a contribuição de tais receptores B_1 para o efeito total de BK parece ser modesta, já que não foram observadas depressões das respostas neurogênicas em resposta à BK mesmo na presença de concentrações elevadas dos antagonistas de receptor B_2 , Hoe 140 ou NPC 17731 (acima de 1 μ M).

Pelo menos parte dos receptores B_2 mediando a potencialização das contrações neurogênicas parece estar localizada pós-juncionalmente, visto que a BK também potencializou as respostas a uma concentração equiefetiva de ATP exógeno, mas não de noradrenalina. É interessante observar que a ativação tanto dos receptores purinérgicos P_{2x} (Sneddon e Burnstock, 1984) como dos receptores do tipo B_2 pós-juncionais, resulta num aumento do influxo de cálcio extracelular (Graier et al., 1992). Desse modo, é possível que exista uma interação, em nível de segundos mensageiros, decorrente da ativação dos receptores B_2 com os receptores purinérgicos P_{2x} (que medeiam os efeitos contráteis do ATP), facilitando assim a resposta ao ATP. Do mesmo modo, esse efeito também foi bloqueado por NPC 17731 e Hoe 140, mas não por [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK. Contudo, os

receptores B_2 podem também estar presentes nas varicosidades nervosas simpáticas do ducto deferente de camundongo já que, a exemplo do que ocorre no ducto deferente de rato (Llona *et al.*, 1987), a BK aumenta a liberação [3H]-noradrenalina induzida por estimulação elétrica de campo (Llona *et al.*, 1991). Por outro lado, a localização de receptores B_1 mediando a inibição das respostas neurogênicas parece ser principalmente pré-juncional, uma vez que a [des-Arg⁹]-BK não afetou as contrações induzidas por ATP ou noradrenalina. A presença do receptor B_1 no ducto deferente de camundongo sugere a possibilidade da existência dos mesmos no ducto deferente de rato e de outras espécies. Embora isso não tenha sido demonstrado pelos estudos feitos até o momento, talvez com o uso de agonistas e antagonistas mais seletivos, ou através de técnicas mais apuradas, seja possível determinar se outras espécies apresentam o mesmo perfil de distribuição dos receptores para cininas presente no ducto deferente de camundongo.

Muitos tecidos normalmente não contêm receptores B_1 , mas a expressão desses receptores B_1 pode ser induzida por diversos estímulos ou condições especiais (para revisão ver Marceau e Regoli, 1991; Hall, 1992). Porém, tem sido proposta a ocorrência de receptores B_1 constitutivos no duodeno (Boschcov *et al.*, 1984), fundo do estômago (Calixto e Medeiros, 1992b) e veia porta de rato (Campos e Calixto, 1994). Parece-nos possível sugerir que os receptores B_1 e B_2 no ducto deferente de camundongo são constitutivos, dado que as respostas mediadas por esses tipos de receptores foram evidenciadas imediatamente após o término do período de equilíbrio e permaneceram reproduzíveis por mais de oito horas após a montagem da preparação.

É difícil explicar a ocorrência de receptores B_1 constitutivos no ducto

deferente de camundongo, e muito menos atribuir-lhes um papel fisiológico, posto que a BK não parece ser capaz de ativá-los. Entretanto, existem teorias que apontam um papel da [des-Arg⁹]-BK como o ligante endógeno de receptores B₁ (Drapeau *et al.*, 1991, para revisão ver Hall, 1992). Nesse contexto, é razoável atribuir à [des-Arg⁹]-BK uma participação importante como neuromodulador nessa junção neuromuscular simpática. Isto é, assim como é proposto o envolvimento dos receptores B₁-induzidos, ativados pela BK, com processos inflamatórios agudos, receptores B₁ constitutivos podem estar envolvidos na modulação, exercida pela [des-Arg⁹]-BK, sobre os sistemas neuroefetadores presentes. No entanto, as evidências aqui apresentadas são ainda insuficientes para provar que os receptores B₁ presentes no ducto deferente de camundongo são realmente constitutivos, de modo que a importância da [des-Arg⁹]-BK permanece no campo das teorias.

Concluindo, demonstramos que, ao contrário do que tem sido relatado no ducto deferente de rato, as cininas exercem influências inibitórias e facilitatórias na neurotransmissão simpática do ducto deferente de camundongo. Enquanto a influência facilitatória parece envolver receptores B₂ pré- e pós-juncionais, a inibição neurogênica é mediada por estimulação de receptores B₁, presumivelmente localizados nas varicosidades neuronais simpáticas (figura 15b). Estudos adicionais serão necessários para esclarecer os mecanismos celulares desencadeados pela ativação de ambos os tipos de receptores de cininas e sua possível relevância para a transmissão nessa junção neuromuscular autonômica simpática.

Parte desses resultados foram publicados no *European J. of Pharmacology* (276: 1995) e no *British J. of Pharmacology* (114: 1995).

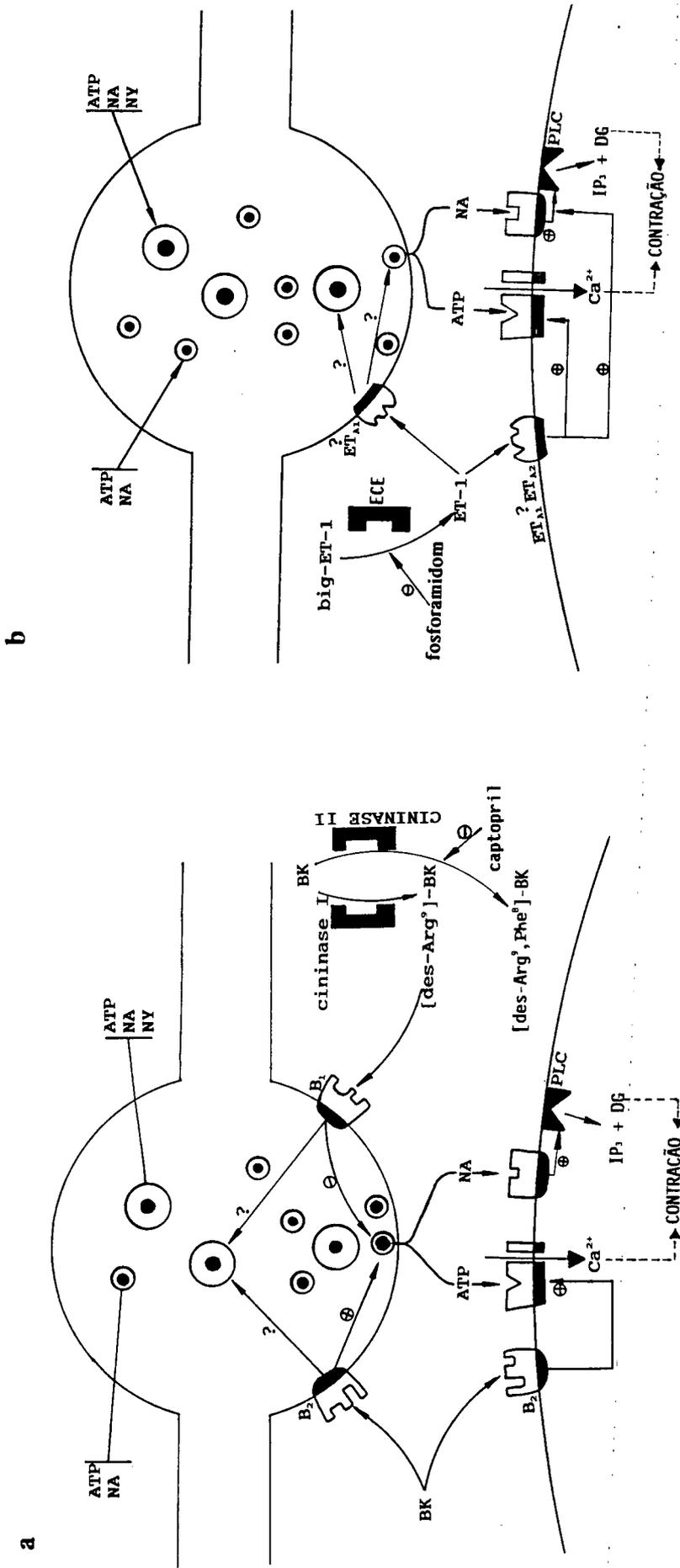


FIGURA - 15 Esquema teórico demonstrando a neuromodulação exercida pelas cininas (painel a) e endotelinas (painel b) sobre neurotransmissores simpáticos, bem como uma possível localização dos receptores para cininas e endotelinas numa junção neuroefetora simpática no ducto deferente de camundongo. ECE indica enzima conversora para endotelina.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present study attempts to identify the receptors involved in control of sympathetic neurotransmission in the mouse vas deferens by endothelins (ETs), as well as the presence of ET-converting enzyme in this tissue. The receptors mediating the effects of kinins at this neuroeffector junction have also been characterized. Neurogenic contractions were induced by electrical field stimulation of the vas deferens with trains of 4 rectangular 0.5 ms pulses of supramaximal strength, delivered via platinum electrodes at 10 Hz every 20 s.

The experiments conducted with the ETs revealed that:

1. ET-1 or ET-3 (0.01-100 nM) enhanced contractions evoked by field stimulation, yielding EC_{50} s (geometric mean and 95% confidence limits) of 0.7 nM (0.4-1.6) and 13.7 nM (10.2-14.1) and E_{max} s (mean \pm S.E.M. increase in twitch tension, in mg per 10 mg of wet tissue) of 473 ± 35 and 520 ± 51 , respectively.
2. The selective ET_B receptor agonists IRL 1620 and sarafotoxin S6c were inactive up to 100 nM.
3. Responses to ET-3 were progressively inhibited by the selective ET_A receptor antagonist BQ-123 (10, 30 and 100 nM). At 100 nM, BQ-123 almost abolished the response to ET-3 (100 nM).
4. In contrast, at 100, 300 nM and 1 μ M, BQ-123 shifted the curve to ET-1 to the right only 2-, 5- and 6-fold, respectively.
5. The selective ET_B receptor antagonist BQ-788 (100 nM) did not modify responses to ET-1 or ET-3 (0.01 to 100 nM).
6. Big-ET-1 (0.3 to 30 nM) was 10-fold less potent than ET-1 in increasing neurogenic responses (EC_{50} 6.8 nM, 4.7-9.6; E_{max} 457 ± 37).

7. Preincubation with phosphoramidon (100 μM) reduced responses to big-ET-1, but not ET-1.

These findings indicate that ET-1 and ET-3 potently enhance sympathetic neurotransmission in the mouse vas deferens via stimulation of specific receptors, which are insensitive to blockade by BQ-788, but display variable sensitivity to blockade by BQ-123. It remains to be seen if these results reflect the presence (at least in part) of a population of atypical ET receptors (possibly a subtype of ET_A receptor) or are the consequence of binding of ET-1 and ET-3 to different subdomains of a single type of ET_A receptor. Finally, these findings also demonstrate that the mouse vas deferens displays pronounced phosphoramidon-sensitive ET-converting enzyme activity.

The experiments conducted with kinins revealed that:

1. Bradykinin (BK; 0.1-300 nM), as seen with the ETs, induced a graded potentiation of neurogenic contractions, with an EC_{50} of 4.5 nM (1.7-11.6) and an E_{max} of 315 ± 19 .
2. Similar results were obtained in tissues challenged with Lys-BK, [Hyp³]-BK, Met,Lys-BK and the selective B_2 receptor agonist [Tyr(Me)⁸]-BK (0.1-300 nM).
3. The selective B_2 receptor antagonists Hoe 140 (1-10 nM) and NPC 17731 (3-30 nM) caused graded rightward shifts of the curve to BK-induced twitch potentiation, yielding Schild plot slopes not different from 1 and apparent pA_2 values of 9.65 ± 0.09 and 9.08 ± 0.13 , respectively. Both antagonists (100 nM) failed to modify similar twitch potentiations induced by substance P (3 nM) or endothelin-1 (1 nM).
4. Preincubation with the selective B_1 receptor antagonist [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK (1 μM) increased the potentiating effect of 30-300 nM BK on twitches.

5. In contrast to BK, the selective B₁ receptor agonist [des-Arg⁹]-BK (0.3-1000 nM) reduced the amplitude of neurogenic contractions in a graded fashion, with an IC₅₀ of 13.7 nM (10.4-16.1) and an I_{max} of 175 ± 11 mg (*n* = 4).
6. The twitch depression induced by [des-Arg⁹]-BK (300 nM) was not affected by Hoe 140 (30 nM) or NPC 17731 (100 nM), but was abolished by the selective B₁ receptor antagonist [Leu⁸,des-Arg⁹]-BK (1 μM), which did not modify the twitch inhibitory effect of clonidine (1 nM) or morphine (300 nM).
7. In non-stimulated preparations, BK (100 nM) also potentiated, in a Hoe 140- (10 nM) and NPC 17731-sensitive (10 nM) manner, the contractions induced by ATP (100 μM), but not by noradrenaline (10 μM), whereas [des-Arg⁹]-BK (300 nM) did not modify the contractions induced by either agonist.

These results demonstrate that the mouse vas deferens expresses both B₁ and B₂ receptors, which modulate sympathetic neurotransmission in opposing ways. Neurogenic contractions are inhibited by stimulation of possibly prejunctional B₁ receptors. On the other hand, activation of B₂ receptors increases twitch contractions, in part by amplifying the responsiveness of the smooth muscle cells to the sympathetic co-transmitter ATP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOUS, J.E.; BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C. R. Soc. Biol.*, (Paris) **66**: 511-512, 1909.
- ACEVEDO, C.G.; LEWIN, J.; CONTRERAS, E. et al. Bradykinin facilitates the purinergic motor component of the rat bladder neurotransmission. *Neurosci. Lett.*, **113**: 227-232, 1990.
- AGRICOLA, K; RUBANYI, G; PAUL, R.J. Characterization of a potent coronary artery vasoconstrictor produced by endothelial cells in culture. *Fed. Proc.*, **43**: 899-904, 1984.
- 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. et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**: 730-732, 1990.
- ARAMORI, I.; NIREI, H.; SHOUBO, M. Subtype selectively of a novel endothelin antagonist, FR139317, for the two endothelin receptors in transfected chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.*, **43**: 127-131, 1993.
- ARUNLAKSHANA. O.; SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **14**: 48-58, 1959.
- ASGHAR, A.U.R.; WHEELDON, A.; BIRCH, P.J. Characterization of bradykinin receptors in the electrically-stimulated rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 59P, 1993.
- BATTISTINI, B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SIROIS, P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.*, **68**: 600-628, 1993.

- BEINBORN, M.; LEE, Y.M.; MCBRIDE, E.W. *et al.* 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.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinin: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**: 1-80, 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.
- BLOCH, D.K.; HONG, C.C.; EDY, R.L. *et al.* cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene-vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. *Genomics*, **10**: 236-242, 1991.
- BOISSONNAS, R.A.; GUTTMANN, St.; JAQUENOUD, P.-A. *et al.* Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia*, **16**: 326, 1960.
- BOLAND, B.; HIMPENS, B.; VINCENT, M.F. *et al.* ATP activates P_{2x} -contracting and P_{2y} -relaxing purinoceptors in the smooth muscle of mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 1152-1158, 1992.
- BOSCHCOV, P.; PAIVA, A.C.M.; PAIVA, T.B. *et al.* Further evidence for the existence of two receptor sites for bradykinin responsible for the biphasic effect in the rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **83**: 591-600, 1984.
- BOULANGER, C.; SCHINI, V.B.; MONCADA, S. *et al.* Stimulation of cyclic GMP production in cultured endothelial cells of the pig by bradykinin, adenosine diphosphate, calcium ionophore A23187 and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 152-156, 1990.

- BRAQUET, P.; TOUVAY, C.; LAGENTE, V. *et al.* Effect of endothelin-1 on blood pressure and bronchopulmonary system of the guinea pig. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13** (Suppl. 5): S143-S146, 1989.
- BRITOS, J.; NOLLY, H. Kinin-forming enzyme of rat cardiac tissue. Subcellular distribution and biochemical properties. *Hypertension*, **3** (suppl. II): 42-45, 1981.
- BRUNTON, L.L.; WIKLUND, R.A.; VANARSDALE, P.M. *et al.* Binding of [³H] prostaglandin E₁ to putative receptors linked to adenylate cyclase of cultured cell clones. *J. Biol. Chem.*, **251**: 3037-3044, 1976.
- BURCH, R.M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T6 fibroblasts: evidence for a G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 6374-6378, 1987.
- BURCH, R.M.; FARMER, S.G.; STERANKA, L.R. Bradykinin receptor antagonists. *Medic. Res. Rev.*, **10**: 237-269, 1990.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J.; STORMANN, T.M. Molecular biological approaches to the study of bradykinin receptors. In: *Molecular Biology and Pharmacology of Bradykinin Receptors*. ed. Burch, R.M., Kyle, D.J., Stormann, T.M., pp. 19-32, Austin: R.G. Landes Company, 1993.
- CAHILL, H.; FISHMAN, J.B.; POLGAR, P. Effect of des-Arginine⁹-bradykinin fragments on the synthesis of prostacyclin and the binding of bradykinin by vascular cells in culture. *Agents Actions*, **24**: 224-231, 1988.
- CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effect of protein kinase C and calcium on bradykinin-mediated contractions of rabbit vessels. *Hypertension*, **19**: 87-93, 1992a.
- CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Bradykinin-induced biphasic response in the rat isolated stomach fundus: functional evidence for a novel bradykinin receptor. *Life Sci.*, **50**: PL47, 1992b.

- 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.
- CAMARGO, A.C.M.; RAMALHO-PINTO, F.J.; GREENE, L.J. Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones. *J. Neurochem.*, **19**: 37-49, 1972.
- CAMPOS, A.H.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein ring: mediation by B₁ and B₂ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**: 902-909, 1994.
- CASEY, M.L.; BYRD, W.; MACDONALD, P.C. Massive amounts of immunoreactive endothelin in human seminal fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **74**: 223-228, 1992.
- CHAO, J.; CHAO. I. Identification and expression of kallikrein gene family in rat submandibular and prostate glands using monoclonal antibodies as specific probes. *Biochim. Biophys. Acta*, **910**: 233-239, 1987.
- CLOZEL, M.; BREU, V.; BURRI, K. et al. The discovery of Ro 46-2005, an orally available non-peptide antagonist of ET_A and ET_B receptors. In: *Third International Conference on Endothelin*, Houston, Texas, USA, February 15-17, 1993. Abstract Book, p. 17.
- CLOZEL, M.; BREU, V.; GRAY, G.A. et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**: 228-235, 1994.
- CODY, W.L., DOHERTY, A.M.; HE, J.X.; et al. Design of a functional hexapeptide antagonist of endothelin. *J. Med. Chem.*, **35**: 3301-3303, 1992.
- COHEN-LAROQUE, E.-S.; BÉNY, J.-L.; HUGGEL, H. Microvascular effects of bradykinin in the isolated perfused guinea-pig hindbrain: method and characterization of a possible third type of bradykinin receptor. *Microvasc. Res.*, **40**: 55-62, 1990.
- COLLIER, H.O.J. Kinins and ventilation of the lungs. In: *Handbook of Experimental*

- Pharmacology. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein*, ed. Erdos, E.G., pp. 409-420, Berlin: Springer-Verlag, 1970.
- COOK, S.J.; PALMER, S.; PLEVIN, R. *et al.* Mass measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate and *s,n*-1,2-diacylglycerol in bombesin-stimulated Swiss 3T3 mouse fibroblasts. *Biochem. J.*, **265**: 617-620, 1990.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 193-198, 1993.
- DAVENPORT, A.P.; MAGUIRE, J.J. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET_A receptors in humans? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 9-11, 1994.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLEANS-JUSTE, P. *et al.* 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. USA.*, **85**: 9797-9800, 1988.
- DONOSO, M.V.; HUIDOBRO-TORO, J.P. Involvement of postjunctional purinergic mechanisms in the facilitatory action of bradykinin in neurotransmission in the rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **160**: 263-273, 1989.
- DONOSO, M.V.; MONTES, C.G.; LEWIN, J. *et al.* Endothelin-1-induced mobilization of intracellular Ca²⁺ stores from the smooth muscle facilitates sympathetic cotransmission by potentiation of adenosine 5'-triphosphate (ATP) motor activity: studies in the rat vas deferens, *Peptides*, **13**: 813-840, 1992.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; CLAING, A.; TÉLÉMAQUE, S. *et al.* Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A₂ from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ET_B antagonist, BQ-788. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1257-1262, 1994.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Kinins act on B₁ and B₂ receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin

- from bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 920-926, 1989.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; LIDBURY, P.S.; WARNER, T.D. Intravascular big-endothelin increases circulating levels of endothelin-1 and prostanoids in the rabbit. *Biochem. Pharmacol.*, **39**: 21-22, 1990.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, M. *et al.* Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET_A receptors in the rat perfused lung. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 773-775, 1992.
- DRAKE, M.E.; PETERSEN, S.A. ATP overflow from the mouse isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 825-830, 1992.
- DRAPEAU, G.; DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. Hypotensive effects of Lys-des-Arg⁹-bradykinin and metabolically protected agonists of B₁ receptors for kinins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**: 997-1003, 1991.
- EGLEZOS, A., CUCCHI, P.; PATACCHINI, R. *et al.* Differential effects of BQ-123 against endothelin-1 and endothelin-3 on the rat vas deferens: evidence for an atypical endothelin receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 736-738, 1993.
- ELLIOT, D.F.; LEWIS, G.P.; HORTON, E.W. The structure of bradykinin- a plasma kinin from ox blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**: 87-91, 1960.
- 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.
- FAGNI, C.; MICHEL, A.; LEONARD, I. *et al.* In vitro degradation of endothelin-1 by endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *Peptides*, **12**: 773-778, 1991.
- FARMER, S.G.; BURCH, R.M. The pharmacology of bradykinin receptors. In: *Bradykinin Antagonists. Basic and Clinical Research*, New York: (ed.) Marcel Dekker, Inc., pp. 1-31, 1991.
- FARMER, S.G.; BURCH, R.M.; MEEKER, S.N. *et al.* Evidence for a pulmonary B₂ bradykinin receptor. *Molec. Pharmacol.*, **36**: 1-8, 1989.
- FARMER, S.G.; ENSOR, J.E.; BURCH, R.M. Evidence that cultured airway smooth

- muscle cells contain bradykinin B₂ and B₃ receptors. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, **4**: 273-277, 1991.
- FIEDLER, F. Enzymology of glandular kallikreins. In: *Bradykinin, Kallidin, and kallikrein*, Berlin: ed. by E.G. Erdös, Springer-Verlag, pp. 103-161, 1979.
- FIELD, J.L.; HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. Bradykinin receptors in the guinea-pig taenia caeci are similar to proposed BK₃ receptors in the guinea-pig trachea and are blocked by Hoe 140. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 293-296, 1992.
- FLEMING, W.W.; WESTFALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S. et al. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **181**: 339-345, 1972.
- FONG, T.M.; CASCIERI, M.A.; YU, H. et al. Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345. *Nature*, **362**: 350-356, 1993.
- GETHER, U.; JOHANSEN, T. E.; SCHWARTZ, T. W. Chimeric NK₁ (substance P)/NK₃ (neurokinin B) receptors: identification of domains determining the binding specificity of tachykinin agonists. *J. Biol. Chem.*, **268**: 7893, 1993a.
- GETHER, U.; JOHANSEN, T.E.; SNIDER, S.N. et al. Different binding epitopes on the NK₁ receptor for substance P and a non-peptide antagonist. *Nature*, **362**: 345-349, 1993b.
- GILLESPIE, M.N.; OWASOYO, J.O.; MCMURTRY, I.F. et al. Sustained coronary vasoconstrictor provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in cultured. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**: 339-343, 1986.
- GOLDSTEIN, R.H.; WALL, M. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin. *J. Biol. Chem.*, **259**: 9263-9268, 1984.
- GRAIER, W.F.; SCHMIDT, K.; KUKOVETK, W.R. Is the bradykinin-induced Ca²⁺ influx and the formation of endothelium-derived relaxing factor mediated by a G protein? *Eur. J. Pharmacol.*, **225**: 43-49, 1992.
- GRAY, G.A.; CLOZEL, M.; BREU, V. et al. In vitro pharmacological properties of

- Ro 46-2005, a non-peptide antagonist of ET_A and ET_B receptors. In: *Third International Conference on Endothelin*. Houston, Texas, USA, February 15-17, 1993. Abstract Book, p. 37.
- GRIENDLING, K.K.; TSUDA, T.; ALEXANDER, R.W. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8237-8240, 1989.
- GRIESBACHER, T.; LEMBECK, F. Analysis of the antagonistic action of HOE 140 and other novel bradykinin analogues in the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**: 393-398, 1992.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190, 1992.
- HALL, J.M.; CAULFIELD, M.P.; WATSON, S.P. *et al.* Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **14**: 376-383, 1993.
- HAMMAMI, M.M.; HAQ, A.; AL-SEDAIRY, S. The level of endothelin-like immunoreactivity in seminal fluid correlates positively with semen volume and negatively with plasma gonadotrophin levels. *Clin. Endocrinol.*, **40**: 361-369, 1994.
- HAN, S.P.; KNUEPFER, N.N.; TRAPANI, A.J. *et al.* Endothelin and sarafotoxin S6c have similar vasoconstrictor effects and postsynaptically mediated mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.*, **177**: 29-34, 1990.
- HAYNES, W.G.; WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin. Sci.*, **84**: 485-500, 1993.
- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; MACNEIL, T. *et al.* Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. *Mol. Pharmacol.*, **45**: 1-8, 1994.
- HICKEY, K.A.; RUBANNYI, G.; PAUL, R.J. *et al.* Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **248**:

C550-556, 1985.

- HIRATA, Y.; EMORI, T.; EGUCHI, S. *et al.* Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **91**: 1367-1373, 1993.
- HIRATA, Y.; KANNO, K.; WATANABE, T. *et al.* Receptor binding and vasoconstrictor activity of big-endothelin. *Eur. J. Pharmacol.*, **176**: 225-230, 1990.
- HOCK, F.J.; WIRTH, K.; ALBUS, U. *et al.* Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 769-773, 1991.
- HOLDEN, W.E.; McCALL, E. Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium. *Expl. Lung. Res.*, **7**: 101-112, 1983.
- HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J. Physiol.*, **449**: 295-311, 1992.
- HORI, M.; SUDJARWO, S.A.; ODA, K. *et al.* Two types of endothelin_B receptors mediating relaxation in the guinea pig ileum. *Life Sci.*, **54**: 645-652, 1994.
- HORWITZ, . Bradykinin activates a phospholipase D that hydrolyses phosphatidylcholine in PC12 cells. *J. Neurochem.*, **56**: 509-517, 1991.
- HUGGINS, J.P.; PELTON, J.T.; MILLER, R.C. The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in Physiology and Medicine. *Pharmacol. Ther.*, **59**: 55-123, 1993.
- HUIDOBRO-TORO, J.P.; HERREROS, R.; PINTO-CORRADO, A. Pre- and postsynaptic bradykinin responses in the rat vas deferens: asymmetric distribution of the postsynaptic effect. *Eur. J. Pharmacol.*, **121**: 305-311, 1986.
- 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. *et al.* Biological profiles of highly potent

- endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.*, **50**: 247-255, 1992a.
- IHARA, M.; SAEKI, T.; FUKURODA, T. et al. A novel radioligand [¹²⁵I]BQ-3020 selective for endothelin (ET_B) receptors. *Life Sci.*, **51**: P47-P52, 1992b.
- ILLES, P.; STARKE, K. An electrophysiological study of presynaptic α₂-adrenoceptors in the vas deferens of the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **78**: 365-373, 1983.
- INOUE, A; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y. et al. The human preproendothelin-1 gene. *J. Biol. Chem.*, **264**: 14954-14959, 1989.
- ISHII, K.; WARNER, T.D.; SHENG, H. et al. Endothelin increases cyclic GMP levels in LLC-PK₁ porcine kidney epithelial cells via formation of an endothelium-derived relaxing factor-like substance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**: 1102-1108, 1991.
- ISHIKAWA, K., IHARA, M.; NOGUCHI, K. et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective ET_B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 4892-4896, 1994.
- ISSANDOU, M.; DARBON, J.-M. Des-Arg⁹-bradykinin modulates DNA synthesis, phospholipase C and protein kinase C in cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, **266**: 21037-21043, 1991.
- JAFFE, E.M. Physiologic Functions of Normal Endothelial Cells. In.: *Atherosclerosis*. Reprinted from vol. 454, 1987. **Annals of the New York Academy of Sciences**.
- KARNE, S.; JAYAWICKREME, C.K.; LERNER, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.*, **268**: 19126-19133, 1993.
- KASUYA, Y.; TAKUWA, Y.; YANAGISAWA, M. et al. Endothelin-1 induces

- vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**: 1049-1055, 1989.
- KENAKIN, T.P. Mechanisms of drug action and receptor classification. In: *Pharmacologic Analysis of Drug-receptor Interaction*. New York: ed. Kenakin, T.P. 2nd edn., pp. 344-384, 1993.
- KIMURA, S.; KASUYA, Y.; SAWAMURA, T. *et al.* Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13 (Suppl. 5)**: S5-S7, 1989.
- KOCHVA, E., BDOLAH, A. e WOLLBERG, Z. Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function. *Toxicol.*, **31**: 541-568, 1993.
- KOZUKA, M.; ITO, T.; HIROSE, S. *et al.* Endothelin action on rat uterus is inhibited by an inhibitor of protein kinase C and by inhibitors of the phospholipase A₂-arachidonic acid-lipoxygenase pathway. *Biomed. Res.*, **11**: 287-289, 1990.
- KRAUT, H.; FREY, E.K.; WERLE, E. Über die Inaktivierung des Kallikreins. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **192**: 1-21, 1930.
- KUMAR, C.S.; MWANGI, V.; NUTHULAGANTI, P. *et al.* Cloning and characterization of a novel endothelin receptor from *Xenopus* heart. *J. Biol. Chem.*, **269**: 13414-13420, 1994.
- KUMAR, C.S.; NUTHULAGANTI, P.; PULLEN, M. *et al.* Novel endothelin receptors in the follicular membranes of *Xenopus laevis* oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions. *Mol. Pharmacol.*, **44**: 153-157, 1993.
- KURIHARA, T.; AKOMOTO, M.; KURUKAWA, K. *et al.* ET-3 sensitive reduction of tissue

- bloodflow in rat liver. *Life Sci.*, **51**: 101-106, 1992.
- KURZ, K.; von KÜGELGEN, I.; STARKE, K. Prejunctional modulation of noradrenaline release in mouse and rat vas deferens: contribution of P₁- and P₂-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 1465-1472, 1993.
- KYLE, D.J.; BURCH, R.M. Recent advances toward novel bradykinin antagonist. *Drugs of the Future*, **17**: 305-312, 1992.
- KYLE, D.J.; BURCH, R.M. A survey of bradykinin receptors and their antagonists. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2**: 5-20, 1993.
- LANGENSTRÖER, P.; TANG, R.; SHAPIRO, E. *et al.* Endothelin-1 in the human prostate - tissue levels, source of production and isometric tension studies. *J. Urol.*, **150**: 495-499, 1993.
- LEE, J.A.; ELLIOTT, J.D.; SUTIPHONG, J.A. *et al.* 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.; GRIESBACHER, T.; ECKHARDT, M. *et al.* New, long-acting, potent bradykinin antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 297-304, 1991.
- LIEBMANN, C.; REISSMANN, S.; ROBBERECHT, P. *et al.* Bradykinin action in the rat duodenum: Receptor binding and influence on the cyclic AMP system. *Biomed. Biochim. Acta.*, **46**: 469-478, 1987.
- LLONA, I.; VAVREK, R.; STEWART, J. *et al.* Identification of pre- and postsynaptic bradykinin receptor sites in the vas deferens: evidence for different structural prerequisites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**: 608-614, 1987.
- LLONA, I.; GALLEGUILLOS, X.; BELMAR, J. *et al.* Bradykinin modulates the release of noradrenaline from vas deferens nerve terminals. *Life Sci.*, **48**: 2585-2592, 1991.
- LORD, J.A.H.; WATERFIELD, A.A.; HUGHES, J. *et al.* Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*, **267**: 495-499, 1977.
- LUEDDECKENS, G.; BIGL, H.; SPERLING, J. Importance of secondary TXA₂ release in mediating of endothelin-1 induced bronchoconstriction and vasopressin in the

- guinea-pig. *Prost. Leuk. Essent. Acids*, **48**: 261-263, 1993.
- MACNULTY, E.E.; PLEVIN, R.; WAKELAM, M.J.D. Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for rat-1 fibroblasts. *Biochem. J.*, **272**: 761-767, 1990.
- MACEACHERN, A.E.; SHELTON, E.R.; BHAKTA, S. *et al.* Expression cloning of a rat B₂ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 7724-7728, 1991.
- MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, R. *et al.* The activity of peptides of the endothelin family in various mammalian smooth muscle preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, **174**: 23-31, 1989.
- MANZINI, S.; PARLANI, M. Opposite prejunctional modulation by NK₁ receptor and CGRP of adrenergic control of mouse vas deferens motility. In: *International Symposium on Substance P and Related Peptides* (Shizuoka, Japan, 3-6 November), S104, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992.
- MARCEAU, F.; REGOLI, D. Kinin receptors of the B₁ type and their antagonists. In: *Bradykinin Antagonists. Basic and Clinical Research*, New York: ed. Marcel Dekker, Inc., pp. 33-49, 1991.
- MARCEAU, F.; TREMBLAY, B. Mitogenic effect of bradykinin and of des-Arg⁹-bradykinin on cultured fibroblasts. *Life Sci.*, **39**: 2351-2358, 1986.
- MASAKI, T.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med. Res. Rev.*, **12**: 391-421, 1992.
- MASAKI, T., YANAGISAWA, M., GOTO, K. *et al.* **Cardiovascular Significance of Endothelium-Derived Vasoactive Factors**. *Futura Publishing*, New York, p. 65, 1991.
- MASON, A.J.; EVANS, B.A.; COX, D.R. *et al.* Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing active peptides. *Nature*, **303**: 300-307, 1983.

- MATSUMOTO, H.; SUZUKI, N.; ONDA, H. *et al.* Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 74-80, 1989.
- MATTERA, G.G.; EGGLEZOS, A.; RENZETTI, A.R. *et al.* Comparison of the cardiovascular and neural activity of endothelin-1,-2,-3 and respective proendothelins: effects of phosphoramidon and thiorphan. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 331-337, 1993.
- MEDEIROS, Y.S.; CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the biphasic responses to bradykinin in circular muscle from guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **241**: 157-163, 1993.
- MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERELO, K.K. *et al.* Expression cloning of human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21583-21586, 1994.
- MOVAT, H.Z. The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. In: *Bradykinin, Kallidin and Kallikrein*, Berlin: ed. by E. G. Erdös, Springer-Verlag, pp. 1-89, 1979.
- NAKAJIMA, K.; KUBO, S.; KUMAGAE, S. *et al.* Structure-activity relationships of endothelin: importance of charged groups. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**: 424-429, 1989.
- NOLLY, H.; SCICLI, A.; SCICLI, G. *et al.* Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein. *Circ. Res.*, **56**: 816-821, 1985.
- O'BRIEN, R.F.; MCMURTRY, I.F. Endothelial cell (EC) supernatants contract bovine pulmonary artery (PA) rings. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **129**: A337, 1984.
- OHLSTEIN, E.H.; NAMBI, P.; DOUGLAS, S.A. *et al.* SB 209670, a rationally designed potent nonpeptide endothelin receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**:

8052-8056, 1994.

OPGENORTH, T.J.; WU-WONG, J.R.; SHIOSAKI, K. Endothelin-converting enzymes. *FASEB*, **6**: 2653-2659, 1992.

PALMER, R.M.J.; FERRIDGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526, 1987.

PAYNE, A.N.; WHITTLE, B.J.R. Potent cyclo-oxygenase-mediated bronchoconstrictor effects of endothelin in the guinea-pig in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 303-304, 1988.

PERKINS, M.N.; BURGESS, G.M.; CAMPBELL, E.A. *et al.* Hoe 140: a novel bradykinin analogue that is a potent antagonist at both B₂ and B₃ receptors *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 171P, 1991.

POWERS, C.A.; NASJLETTI, A. A major sex difference in kallikrein-like activity in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*, **114**: 1841-1844, 1984.

PURKISS, J.; MURRIN, R.A.; OWEN, P.J. *et al.* Lack of phospholipase D activity in chromaffin cells: bradykinin-stimulated phosphatidic acid formation involves phospholipase C in chromaffin cells but phospholipase D in PC12 cells. *J. Neurochem.*, **57**: 1084-1087, 1991.

RABITO, S.F.; SCICLI, A.G.; KHER, V. *et al.* Immunoreactive glandular kallikrein in rat plasma: a radioimmunoassay for its determination. *Am. J. Physiol.*, **242**: 602-610, 1982.

RAE, G.A.; CALIXTO, J.B. Effects of endothelins on nerve-mediated contractions of mouse vas deferens. *Life Sci.*, **47**: PL83-PL89, 1990.

RAE, G.A.; CALIXTO, J.B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Big-endothelin-1 contracts rat isolated uterus via a phosphoramidon-sensitive endothelin ETA 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. Peptides*, **55**: 1-80, 1995.
- RAE, G.A.; TRYBULEC, G.; DE NUCCI, G. *et al.* Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13** (suppl. 5): S89-S92, 1989.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**: 1-46, 1980.
- REGOLI, D.; CADIEUX, A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Vasoactive peptides and their receptors, in: *Methods in Neurosciences; Receptors, Model Systems and Specific Receptors*, ed. P.M. Conn (Academic Press, San Diego) Vol. 2, p. 43, 1993.
- REID, J.J.; WONG-DUSTING, H.K.; RAND, M.J. The effect of endothelin on noradrenergic transmission in rat and guinea pig atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **168**: 93-96, 1989.
- RESINK, T.J., HAHN, A.W.A.; SCOTT-BURDEN, T. *et al.* Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**: 1303-1310, 1990.
- RESINK, T.J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F.R. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**: 1360-1368, 1988.
- RESINK, T.J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F.R. Activation of phospholipase A₂ by endothelin cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**: 279-286, 1989.
- 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.
- RHALEB, N.E.; ROUISSI, N.; JUKIC, D. *et al.* Pharmacological characterization of a new highly potent B₂ receptor antagonist (Hoe 140: D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸] bradykinin). *Eur. J. Pharmacol.*, **210**: 115-120, 1992.
- RIFO, J.; POURRAT, M.; VAVREK, R.J. *et al.* Bradykinin receptor antagonists used to characterize the heterogeneity of the bradykinin-induced responses in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **142**: 305-312, 1987.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venom and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, **156**: 261-273, 1949.
- RUBANYI, G.M.; POLOKOFF, M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.*, **3**: 325-415, 1994.
- 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. *et al.* Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin_A-selective antagonist and endothelin_B-selective agonists. *J. Biol. Chem.*, **268**: 8547-8553, 1993.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. *et al.* Molecular characterization of endothelin receptors. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **13**: 103-108, 1992.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-

- isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**: 732-735, 1990.
- SCHUMACHER, W.A.; STEINBACHER, T.E.; ALLEN, G.T. Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins*, **40**: 71-79, 1990.
- SEIDAH, W.G.; LADENHEIM, R.; MBIKAY, M.; *et al*. The DNA structure of the rat plasma kallikrein. *DNA*, **8**: 563-574, 1989.
- 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.
- SHIMOJO, N.; CHAO, J.; CHAO, L. *et al*. Identification and characterization of a tissue kallikrein in rat skeletal muscles. *Biochem. J.*, **243**: 773-778, 1987.
- SHINMI, O.; KIMURA, S.; YOSHIKAWA, T. *et al*. Presence of endothelin-1 in porcine spinal cord: isolation and sequence determination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**: 340-346, 1989.
- SIMONSON, M.S. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.*, **73**: 375-411, 1993.
- SIMONSON, M.S.; OSANAI, T.; DUNN, M.J. Endothelin isopeptides evoke Ca^{2+} signalling and oscillations of cytosolic free $[Ca^{2+}]$ in human mesangial cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **1055**: 63-68, 1990.
- SKEGGS, L.T.; KAHN, J.R.; SHUMWAY, N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.*, **103**: 295-299, 1956.
- SLIVKA, S.R.; INSEL, P.A. Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis

- in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, **263**: 14640-14647, 1988.
- SNEDDON, P.; BURNSTOCK, G. Do we need γ -receptors? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **5**: 264-265, 1984.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarofotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signalling. *Pharmacol. Ther.*, **54**: 129-149, 1992.
- STEIN, P.; HUNT, J.T.; FLOYD, D.M. *et al.* The discovery of sulfonamide endothelin antagonists and the development of the orally active ET_A antagonist 5-(dimethylamino)-*N*-(3,4-dimethyl-5-isoxazoly)-1-naphthalenesulfonamide. *J. Med. Chem.*, **37**: 329-331, 1994.
- STJÄRNE, L.; LUNDBERG, J.M.; ÅSTRAND, P. Neuropeptide Y -A cotransmitter with noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in the sympathetic nerves of the mouse vas deferens? A biochemical, physiological and electropharmacological study. *Neurosci. Lett.*, **18**: 151-166, 1986.
- STOJILCOVIC, S.S.; MERILLI, F.; IIDA, T. *et al.* Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science*, **248**: 1663-1666, 1990.
- STONER, J.; MANGANIELLO, V.C.; VAUGHAN, M. Effects of bradykinin and indomethacin on cyclic GMP and cyclic AMP in lung slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**: 3830-3833, 1973.
- SUDJARWO, S. A.; HORI, M.; TAKAI, M. *et al.* A novel subtype of endothelin_B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci.*, **53**: 431-437, 1993.
- SUDJARWO, S. A.; HORI, M.; TANAKA, T. *et al.* Subtypes of endothelin ET_A e ET_B receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, **200**: 627-633, 1994.
- SUNAKO, M.; KAWAHARA, Y.; HIRATA, K. *et al.* 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.
- SUNG, C.-P.; ARLETH, A.J.; SHIKANO, K. *et al.* Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**: 8-13, 1988.
- TABUCHI, Y.; NAKAMARU, M.; RAKUGI, M. *et al.* Endothelin inhibits presynaptic adrenergic neurotransmission in rat mesenteric artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**: 803-808, 1989.
- TAKAI, M.; UMEMURA, I., YAMASAKI, K. *et al.* A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹, ALA^{11,15}]- endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 953-959, 1992.
- TAKASAKI, C.; TAMIYA, N., BDOLAH, A. *et al.* Sarafotoxins S6: Several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrwing asp) venom that affect the heart. *Toxicon.*, **26**: 543-548, 1988.
- TAKUWA, N.; TAKUWA, Y.; YANAGISAWA, M. *et al.* A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **264**: 7856-7861, 1989.
- TAKUWA, Y.; KASUYA, Y.; TAKUWA, N. *et al.* Endothelin receptor is coupled to phospholipase-C via a pertussis toxin insensitive guanine nucleotide binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **85**: 653-658, 1990.
- TANAKA, T.; TSUKUDA, E., NOZAWA, M. *et al.* RES-701-1, a novel, potent, endothelin

- type B receptor-selective antagonist of microbial origin. *Mol. Pharmacol.*, **45**: 724-730, 1994.
- TÉLÉMAQUE, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Presence of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme which converts big-endothelin-1, but not big-endothelin-3, in the rat vas deferens. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **344**: 505-507, 1991.
- TOUSIGNANT, C.; DION, S.; DRAPEAU, G. *et al.* Characterization of pre- and postjunctional receptors for neurokinins in the rat vas deferens. *Neuropeptides*, **9**: 333-343, 1987.
- TRIFILIEFF, A.; AMRANI, Y.; LANDRY, Y. Comparative actions of new highly potent bradykinin receptor antagonist in the guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **239**: 227-229, 1993.
- VANE, J.R.; GRYGLEWSKI, R.J.; BOTTING, R.M. The endothelial cell as a metabolic and endocrine organ. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **8**: 491-496, 1987.
- VIJAYARAGHAVAN, J.; SCICLI, A.G.; CARRETERO, O.A. *et al.* The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J. Biol. Chem.*, **265**: 14150-14155, 1990.
- von KÜGELGEN, I.; BÜLTMANN, R.; STARKE, K. Effects of suramin and α , β -methylene ATP indicate noradrenaline-ATP cotransmission in the response of the mouse vas deferens to single and low frequency pulses. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **340**: 760-763, 1989.
- WARNER, T.D.; ALLCOCK, G.H.; MICKLEY, E.J. *et al.* Characterization of endothelin receptors mediating the effects of the endothelin/sarafotoxin peptides on autonomic neurotransmission in rat vas deferens and guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 783-789, 1993b.

- WARNER, T.D.; GRAHAM, H.A.; CORDER, R. *et al.* 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, 1993a.
- WARNER, T.D.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **159**: 325-326, 1989.
- WARNER, T.D.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; VANE, J.R. Endothelin-1 and U46619 potentiate selectively the venous responses to nerve stimulation within the perfused superior mesenteric vascular bed of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**: 745-750, 1990.
- WIEMER, G.; WIRTH, K. Production of cycle GMP *via* activation of B₁ and B₂ kinin receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**: 729-733, 1992.
- WIKLUND, N.P.; ÖHLÉN, A.; CEDERQVIST, B. Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in the guinea-pig femoral artery. *Acta Physiol. Scand.*, **134**: 311-312, 1988.
- WIKLUND, N.P.; ÖHLÉN, A.; CEDERQVIST, B. Adrenergic neuromodulation by endothelin in guinea-pig pulmonary artery. *Neurosci. Lett.*, **101**: 269-273, 1989a.
- WIKLUND, N.P.; WIKLUND, C.U.; ÖHLÉN, A. *et al.* Cholinergic neuromodulation by endothelin in guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.*, **101**: 342-346, 1989b.
- WIKLUND, N.P.; ÖHLEN, A.; WIKLUND, C.U. *et al.* Endothelin modulation of neuroeffector transmission in rat and guinea pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **185**: 25-33, 1990.
- WILLIAMS JR., D.J.; JONES, K.L.; PETTIBONE, D. J. *et al.* Sarafotoxin S6c: an

- WILLIAMS JR., D.J.; JONES, K.L.; PETTIBONE, D. J. *et al.* Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 556-561, 1991.
- WIRTH, K.J.; WIENER, G.; SCHÖLKENS, B.A. Des-Arg¹⁰[HOE140] is a potent B₁ bradykinin antagonist. In: *Recent Progress on Kinins*, Vol. 38/II, pp. 406-413, Bönner, G.; Fritz, H.; Unger, T.; Roscher, A.; Luppertz, K. (eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1992.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415, 1988.
- ZEITLIN, I.J.; FAGBEMI, S.O.; PARRATT, J.R. Enzymes in normally perfused and ischaemic dog hearts. *Cardiovasc. Res.*, **23**: 91-97, 1989.
- ZETLER, G.; KAMPMANN, E. An attempt to differentiate the effects of angiotensin II, substance P and bradykinin on the field-stimulated guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **56**: 21-29, 1979.