

VALDECIR MARIA LAURA

**REATIVIDADE DAS PORÇÕES OVARIANA E CERVICAL DO ÚTERO
ISOLADO DE RATA GRÁVIDA E NÃO-GRÁVIDA À ENDOTELINA-1,
OCITOCINA E PROSTAGLANDINA F_{2α}: INFLUÊNCIA DO ESTADO
HORMONAL E PROSTANÓIDE**

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 Alexander Rae

Florianópolis, novembro de 1996.

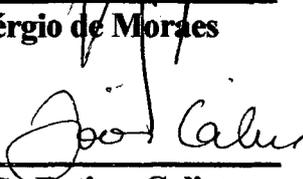
"REATIVIDADE DAS PORÇÕES OVARIANA E CERVICAL DO ÚTERO ISOLADO DE RATA GRÁVIDA E NÃO-GRÁVIDA À ENDOTELINA-1, OCITOCINA E PROSTAGLANDINA F_{2α}: INFLUÊNCIA DO ESTADO HORMONAL E DE PROSTANÓIDES".

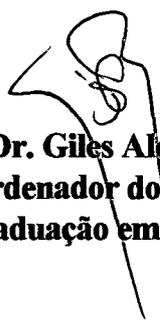
POR

VALDECIR MARIA LAURA

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

Banca Examinadora:

 _____	Giles Alexander Rae	(FMC/UFSC-Orientador)
 _____	Sérgio de Moraes	(ICB/USP-Membro Titular)
 _____	João Batista Calixto	(FMC/UFSC-Membro Titular)


Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em farmacologia

Florianópolis, novembro de 1996.

“Quero que todos os homens sejam tais como também eu sou; no entanto cada um tem de Deus o seu próprio dom; um, na verdade, de um modo, outro de outro. Portanto, sede firmes, inabaláveis, e sempre abundantes na obra do Senhor, sabendo que, no Senhor, o vosso trabalho não é vão” 1 Co 7:7, 15:58

"Sou livre, quando escolho não o que me
agrada, mas o que me realiza como pessoa"

Thoreau

Dedico esta dissertação à minha família, em especial à minha mãe e meus irmãos, que sempre me incentivaram e apoiaram em minha formação acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

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

Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Dr. João Batista Calixto, pelo exemplo de trabalho e dedicação prestado à pesquisa científica desse país. À Prof^a Yara Santos Medeiros, pela amizade e incentivo.

Ao Pastor Renato Becker e sua esposa Walmi pelo carinho e receptividade, e à Prof^a Dr^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e Elizabeth Wazlawik, pela amizade e auxílio prestados quando me instalei nesta cidade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pelo auxílio, de modo especial à Adenir Pereira dos Santos, Paulo Roberto Cardoso e Rosane Ostrosky.

À Josane Reischl, Jonny Maas e Alcibia Helena de A. M. Cardozo pela amizade, apoio e assessoria.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e companheirismo, de modo especial à Mariem El Saleh, Tânia Silvia Fröde Saleh, Márcia Maria de Souza e Anna Paula Piovezan.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIÇÕES	xii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Endotelinas	04
1.2. Ocitocina	08
1.3. Prostaglandinas	10
1.4. Variações segmentares da reatividade do miométrio a agonistas contráteis	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais	15
3.2. Isolamento e montagem das preparações do útero de rata	15
3.3. Protocolos experimentais	16
3.4. Drogas e soluções empregadas	19
3.5. Apresentação dos resultados e análise estatística	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Observações gerais	21
4.2. Comparação dos efeitos da ET-1, OT ou PGF _{2α} em preparações PO e PC do útero isolado de rata numa mesma condição	23

4.3. Comparação dos efeitos da ET-1, OT ou PGF _{2α} no útero isolado de rata em diferentes condições	24
4.4. Comparação entre os efeitos da ET-1, OT ou PGF _{2α} em preparações PO e PC do útero isolado de rata em diferentes condições	33
4.5. Influência da indometacina nos efeitos da ET-1, OT ou PGF _{2α} em preparações PO e PC do útero isolado de rata.....	35
4.6. Influência do ibuprofeno, do piroxicam e da dexametasona nas contrações induzidas por ET-1 no útero isolado de rata na condição FP	43
5. DISCUSSÃO	48
5.1. Resposta à ET-1, OT ou PGF _{2α} das porções ovariana e cervical do útero isolado de rata não-prenhe ou prenhe.....	48
5.2. Influência da indometacina nas contrações do útero isolado de rata induzidas por ET-1, OT ou PGF _{2α} em diferentes condições	59
5.3. Considerações finais	68
6. RESUMO E CONCLUSÕES	70
SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

SUMÁRIO DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Registro isotônico típico dos efeitos contráteis induzidos pela ENDOTELINA-1, OCITOCINA e PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em porções cervicais de miométrio isolado de rata não-prenhe	22
FIGURA 2 - Curvas concentração-efeito à ENDOTELINA-1 em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado rata não-prenhe, prenhe de 12 ou de 21 dias.....	26
FIGURA 3 -Curvas concentração-efeito à OCITOCINA em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado rata não-prenhe, prenhe de 12 ou de 21 dias.....	28
FIGURA 4 -Curvas concentração-efeito à PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado rata não-prenhe, prenhe de 12 ou de 21 dias.....	30
FIGURA 5 -Curvas concentração-efeito à ENDOTELINA-1, OCITOCINA e PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em miométrio isolado de rata não-prenhe, prenhe de 12 e de 21 dias, nas porções ovarianas e nas cervicais	32
FIGURA 6 -Comparação dos efeitos da ENDOTELINA-1, OCITOCINA e PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em miométrio isolado de rata não-prenhe, prenhe de 12 e de 21 dias, nas porções ovarianas e nas cervicais	34
FIGURA 7 -Influência da indometacina, inibidor inespecífico de cicloxigenase, sobre o efeito da ENDOTELINA-1 em miométrio isolado de rata não-prenhe, prenhe de 12 e de 21 dias, nas porções ovarianas e nas cervicais	37
FIGURA 8 -Influência da indometacina, inibidor inespecífico de cicloxigenase, sobre o efeito da OCITOCINA em miométrio isolado de rata não-prenhe, prenhe de 12 e de 21 dias, nas porções ovarianas e cervicais.....	39

FIGURA 9 -Influência da indometacina, inibidor inespecífico de cicloxigenase, sobre o efeito da PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em miométrio isolado de rata não-prenhe, prenhe de 12 e de 21 dias, nas porções ovarianas e cervicais.....	41
FIGURA 10 -Influência da indometacina, ibuprofeno, piroxicam e dexametasona sobre o efeito da ENDOTELINA-1 em útero isolado de rata prenhe de 21 dias	44
FIGURA 11 -Efeito do tratamento prévio <i>in vivo</i> , com indometacina ou dexametasona 48 h e 24 h antes do sacrifício do animal no 21º dia prenhe, sobre as respostas induzidas pela ENDOTELINA-1 em experimentos <i>in vitro</i>	47
TABELA 1 - Efeitos contráteis da ENDOTELINA-1 em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 (MP) ou de 21 dias (FP).....	27
TABELA 2 - Efeitos contráteis da OCITOCINA em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 (MP) ou de 21 dias (FP).....	29
TABELA 3 - Efeitos contráteis da PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MG) ou grávida de 21 dias (FP).....	31
TABELA 4 - Influência da indometacina (5,6 μ M) nos efeitos contráteis da ENDOTELINA-1 em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 (MP) ou de 21 dias (FP)	38
TABELA 5 - Influência da indometacina (5,6 μ M) nos efeitos contráteis da OCITOCINA em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 (MP) ou de 21 dias (FP).....	40

TABELA 6- Influência da indometacina (5,6 μM) nos efeitos contráteis da PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 (MP) ou de 21 dias (FP) 42

TABELA 7 - Influência da indometacina (5,6 μM), ibuprofeno (10 μM), piroxicam (5 μM) e dexametasona (1 μM) nas respostas induzidas por ENDOTELINA-1 no útero isolado de rata em final de prenhez (21 dias) 45

LISTA DE ABREVIações

ACTH	-	hormônio adrenocorticotrópico
AMPc	-	monofosfato cíclico de 3',5'-adenosina
ANOVA	-	análise de variância
CCE	-	curva concentração-efeito
CE ₅₀	-	concentração molar do agonista que causa 50% do efeito máximo do próprio agonista
COX	-	ciclo-oxigenase
COX-1	-	ciclo-oxigenase-1
COX-2	-	ciclo-oxigenase-2
DAG	-	diacilglicerol
ECE	-	enzima conversora de endotelina
ECE-1	-	enzima conversora de endotelina-1
ECE-2	-	enzima conversora de endotelina-2
E _{MAX}	-	efeito máximo
EPM	-	erro padrão da média
ET(s)	-	endotelina(s)
ET-1	-	endotelina-1
ET-2	-	endotelina-2
ET-3	-	endotelina-3
FP	-	final de prenhez
FSH	-	hormônio estimulador de folículo
GnRH	-	hormônio liberador de gonadotropina
IP ₃	-	inositol 1,4,5-trifosfato
LH	-	hormônio luteinizante
MP	-	meio de prenhez
NP	-	não-prenhe
OT	-	ocitocina
PC	-	porção cervical
PG(s)	-	prostaglandina(s)
PGD ₂	-	prostaglandina D ₂
PGE ₂	-	prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	-	prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	-	prostaciclina
PLA ₂	-	fosfolipase A ₂
PLA _{2c}	-	fosfolipase A ₂ citosólica
PLA _{2s}	-	fosfolipase A ₂ solúvel
PLC	-	fosfolipase C
PO	-	porção ovariana
RNA _m	-	ácido ribonucleico mensageiro
TSH	-	hormônio estimulador da tireóide
TXA ₂	-	tromboxano A ₂
VP	-	vasopressina

1 - INTRODUÇÃO

As respostas contráteis do útero grávido ou não-grávido a agentes miotrópicos é controlada, fisiologicamente, por fatores endócrinos, neurais e humorais locais. Entre os fatores endócrinos, os mais relevantes no controle da reatividade uterina são os hormônios esteroidais sexuais estradiol e progesterona, produzidos pelo ovário, bem como a adrenalina, liberada pela medula adrenal, e a ocitocina (OT), produzida pela neurohipófise. A produção dos hormônios esteroidais sexuais pelos ovários é regulada por hormônios hipofisários, como o hormônio luteinizante (LH), o hormônio estimulador de folículo (FSH), o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) e a própria OT. A secreção fisiológica de LH e FSH é regulada positivamente pelo GnRH em nível hipotalâmico, e negativamente pelos hormônios esteroidais sexuais, que atuam inibindo os efeitos desses hormônios (Thorner *et al.*, 1992). Além disso, as alterações na produção de estrógeno e progesterona pelo ovário são importantes no controle funcional e morfológico de outros componentes do trato reprodutivo feminino, como o endométrio uterino e os tecidos adjacentes ao útero, como córion, âmnio, placenta, vagina e ovário (Jones e Challis, 1990).

Há evidências substanciais que as alterações hormonais que ocorrem durante a gestação influenciam marcadamente a reatividade uterina (Marshall, 1962), particularmente com respeito à progesterona e ao estradiol, os quais parecem ser os principais determinantes da aquiescência uterina ao longo de grande parte da gestação e da sua supressão abrupta por ocasião do parto, respectivamente (Csapo, 1981; Garfield, 1982). A progesterona é importante na preparação do endométrio para a implantação do óvulo fecundado, bem como para a manutenção

da gravidez (Swahn e Bygdeman, 1988; Wolf *et al.*, 1989). A aquiescência uterina induzida pela progesterona, durante a gestação, pode envolver dois mecanismos: a redução da expressão dos receptores estrogênicos, e o aumento da expressão dos β_2 -adrenoceptores que por estimularem a formação de monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico (AMPC) inibem a reatividade uterina (Kamm e Stull, 1989; para revisão ver Neulen e Breckwoldt, 1994). Em contrapartida, o estradiol aumenta a reatividade uterina ao final da gestação por estimular, no miométrio, a expressão de receptores para agentes miotrópicos (Maggi *et al.*, 1988; Windmoller *et al.*, 1983; Wollberg *et al.*, 1992) e de junções comunicantes ("gap junctions") entre as células musculares lisas uterinas (Garfield *et al.*, 1988; Chwalisz *et al.*, 1991; Tabb *et al.*, 1992). Além desses mecanismos, a produção de relaxina, outro hormônio produzido exclusivamente pelo corpo lúteo e placenta, parece possuir efeito inibitório sobre a reatividade uterina de camundongos (Vasilenko e Mead, 1987), ratos (Fields *et al.*, 1992), suínos (Sherwood *et al.*, 1993) e primatas (Weiss, 1987; Petersen *et al.*, 1991).

Durante a gravidez, a placenta também exerce funções endócrinas destacadas em muitas espécies, produzindo diversos dos hormônios hipofisários mencionados acima, ou seja LH, FSH, GnRH, bem como progesterona e estradiol (Silver-Khodr e Khodr, 1977; Kriger, 1982; Saijionmaa *et al.*, 1988). Além desses fatores influenciarem diretamente a reatividade uterina, podem ainda reduzir a reatividade da musculatura lisa vascular local (circulação útero-placentária e fetal) ou sistêmica a vasoconstritores fisiologicamente importantes, como a angiotensina II (Gant *et al.*, 1973, 1987) e a adrenalina (Nisell *et al.*, 1985), ou aumentar os níveis circulantes de vasodilatadores, como a prostaciclina (Goodman *et al.*, 1982), acetilcolina e o

“peptídeo relacionado ao gene da calcitonina” (Nelson e Steinland, 1987; Nelson *et al.*, 1993). Tais alterações parecem ser fundamentais na adequação do sistema cardiovascular ao estado gestacional, e falhas nesse processo adaptativo podem estar implicadas em algumas fisiopatologias, como parto prematuro e pré-eclâmpsia em humanos (Tulchinsk *et al.*, 1972; Weir *et al.*, 1975; Hercz, 1985; Clark *et al.*, 1989; Wolff *et al.*, 1993), bem como em cobaias (Sumida *et al.*, 1985; Sierra e Tiffany-Castiglioni, 1992) e bovinos (Schallenberger *et al.*, 1989).

A musculatura lisa do miométrio é inervada por ambas as divisões do sistema nervoso autônomo, através de fibras parassimpáticas colinérgicas do nervo pélvico e de fibras pós-ganglionares simpáticas noradrenérgicas dos gânglios mesentérico inferior e hipogástrico. Os dois tipos de inervação originam respostas excitatórias mediadas por colinoceptores do sub-tipo M_3 e adrenoceptores α_1 , respectivamente, mas a desnervação do útero acarreta *per se* alterações muito discretas da contratilidade do miométrio (Kao, 1977; Kamm e Stull, 1989). Indubitavelmente, o componente autonômico mais relevante no controle da contratilidade do miométrio é exercido pela adrenalina liberada pela medula adrenal, que, por ação endócrina e dependendo do estado fisiológico e da espécie considerada, pode provocar contração ou relaxamento do útero ao interagir com adrenoceptores α_1 ou β_2 , respectivamente.

Há, ainda, alguns fatores humorais locais muito importantes no controle da motilidade uterina, como os eicosanóides (prostanóides e leucotrienos) e possivelmente as endotelinas. A produção desses “hormônios de ação local” (ou autacóides) pelos diversos tecidos uterinos é regulada por diversos fatores endócrinos e por citocinas (Casey *et al.*, 1989; Mitchel, 1991; Sakurai *et al.*, 1991;

Economos *et al.*, 1992; Snyder *et al.*, 1994). Tanto os eicosanóides quanto as endotelinas parecem influenciar de modo importante, ou até mediar, as respostas do miométrio atuando através de mecanismos autócrinos ou parácrinos. Um detalhamento das principais ações das endotelinas e das prostaglandinas, bem como da OT, no útero é apresentada abaixo.

1.1. Endotelina

Descoberta no sobrenadante da cultura de células endoteliais de aorta suína, a endotelina-1 (ET-1) tem como característica mais marcante a capacidade de induzir pronunciado efeito vasopressor *in vivo* e vasoconstritor *in vitro* (Yanagisawa *et al.*, 1988). Estudos subseqüentes verificaram que a ET-1 faz parte de uma família de vários peptídeos que inclui a ET-2, ET-3 (Inoue *et al.*, 1989) e o “peptídeo intestinal vasoconstritor” (ou ET- β), uma variante da ET-2 presente em camundongos e ratos (Bloch *et al.*, 1991). As ETs apresentam grande homologia estrutural com as sarafotoxinas, toxinas presentes no veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (Sokolovsky, 1992).

Cada isoforma de ET é sintetizada a partir de uma pré-pró-ET específica, cada qual codificada por um gene distinto, em duas etapas proteolíticas (Inoue *et al.*, 1989). A primeira clivagem é feita, possivelmente, por uma convertase chamada furina, originando um peptídeo intermediário biologicamente inativo, denominado big-ET (Denault *et al.*, 1995). A segunda clivagem é efetuada por uma enzima conversora de ET (ECE), que converte cada big-ET em seu peptídeo ativo correspondente. Duas ECEs já foram clonadas: a ECE-1 (Xu *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994) e a ECE-2 (Emoto e Yanagisawa, 1995). Essas enzimas podem ser

diferenciadas quanto à sua localização celular, pH ótimo de atividade e sensibilidade ao bloqueio pelo inibidor de metalopeptidases fosforamidom. Por outro lado, as ETs podem ser degradadas por outra metalopeptidase, a endopeptidase neutra [E.C. 3.4.24.11], também chamada de encefalinase (Ronco *et al.*, 1988; Roques *et al.*, 1993). Esta enzima é mais sensível ao bloqueio pelo fosforamidom do que a ECE-1, mas, ao contrário das ECEs, a encefalinase parece exercer uma atividade proteolítica muito mais generalizada, sendo capaz de inativar vários outros peptídeos, incluindo as encefalinas, a bradicinina e a substância P (Dusser *et al.*, 1988; Djokic *et al.*, 1989; Frossard *et al.*, 1989).

Os efeitos das ETs e das sarafotoxinas são mediados pela ativação de receptores endotelinérgicos específicos, que são constituídos de sete domínios transmembrana e acoplados, através de proteínas G, a diversas vias de transdução de sinal (para revisão ver Masaki *et al.*, 1994; Sokolovsky, 1995). Já foram clonados 3 tipos de receptores endotelinérgicos distintos, designados de ET_A, ET_B e ET_C. O receptor ET_A possui maior afinidade por ET-1 e ET-2 que pela ET-3, enquanto que o receptor ET_B apresenta afinidades semelhantes às três isoformas (para revisão ver Masaki *et al.*, 1994). O receptor ET_C foi clonado apenas no genoma de anfíbio, e revela maior afinidade pela ET-3 do que pela ET-1 (Karne *et al.*, 1993). No entanto, há ainda evidências funcionais e bioquímicas para a existência de subtipos de receptores para ET_A e ET_B, e de receptores atípicos (para revisão ver Bax e Saxena, 1994).

A principal via envolvida nos efeitos contráteis mediados por ativação de receptores endotelinérgicos em musculatura lisa vascular ou não-vascular é a da fosfolipase C (PLC), acarretando a produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e

diacilglicerol (DAG) (para revisões ver Huggins *et al.*, 1993; Sokolovsky, 1995). O aumento do IP_3 estimula a mobilização de íons cálcio a partir dos depósitos intracelulares sarcoplasmáticos, enquanto que o DAG ativa as proteínas quinases C, provocando fosforilações protéicas específicas e aumento do influxo de cálcio através de diversos canais catiônicos. Assim, a ativação de receptores endotelinérgicos induz, frequentemente, um aumento da concentração citosólica de cálcio livre. Talvez por esse mecanismo, ou por acoplamento direto mediado por proteína G, as ETs também podem ativar a fosfolipase A_2 (PLA_2) a mobilizar ácido araquidônico para a síntese de dois tipos de eicosanóides: prostanóides ou leucotrienos (Resink *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*, 1989). Dependendo de quais prostanóides são produzidos em resposta à ativação de receptores endotelinérgicos, tais substâncias podem mediar parte dos efeitos contráteis das ETs em alguns tecidos, mas podem também limitar as ações desses peptídeos em outros (Hyslop e De Nucci, 1992). Por outro lado, as ETs também podem, em certos tecidos ou células, modular a atividade da adenilato ciclase, provocando aumento (Sokolovsky, 1992) ou redução dos níveis citosólicos de AMPc (Yang *et al.*, 1991), ou ainda ativar a guanilato ciclase citosólica através da síntese de óxido nítrico em células endoteliais e epiteliais (De Nucci *et al.*, 1988; Filep *et al.*, 1993).

As ETs, principalmente a ET-1, podem ser moduladores importantes da fisiologia reprodutiva feminina. Tanto as ETs quanto os receptores endotelinérgicos são encontrados no útero (Bouso-Mittler *et al.*, 1989; Kozuka *et al.*, 1989; Rae *et al.*, 1993; Word *et al.*, 1990; Maher *et al.*, 1991; Fried *et al.*, 1993), principalmente no endométrio mas também no miométrio, e em tecidos circunvizinhos como placenta, âmnio, veias útero-placentárias e umbilicais (Sunnergren *et al.*, 1990; Hemsén *et al.*,

1991; Svane *et al.*, 1993; Horwitz *et al.*, 1995; Rae *et al.*, 1995). Por outro lado, as ETs são bastante potentes em causarem contrações sustentadas em miométrio não-grávido ou grávido de várias espécies, inclusive em ratas (Calixto e Rae, 1991) e humanos (Word *et al.*, 1990), que parecem ser mediadas, em grande parte, por ativação de receptores ET_A. Contudo, o útero de rata também expressa RNAm para receptores ET_B (Sakurai *et al.*, 1990), mas a função desses receptores na contratilidade uterina nessa espécie não foi ainda caracterizada. No útero humano, Wolff *et al.* (1996) descreveram que os receptores ET_B poderiam mediar respostas relaxantes da porção cervical, a exemplo de prostaglandinas inibitórias (ver abaixo). Assim disfunções na produção ou ação local das ETs poderiam estar implicadas em estados fisiopatológicos como a dismenorréia, parto prematuro e pré-eclampsia (Allen *et al.*, 1989; Nissel *et al.*, 1991; para revisão ver Rae *et al.*, 1995).

Outro fator importante a ser destacado é que a expressão de ET-1 e dos receptores endotelinérgicos no útero é controlada por hormônios esteroidais sexuais. Nesse sentido, há evidências de que a progesterona reduz a densidade de receptores ET_A no útero de coelho e de ovino, enquanto que o oposto ocorre no útero de animais tratados com estrógeno (Riley *et al.*, 1994). Também demonstrou-se que os níveis de RNAm para ET-1 no endométrio humano variam no transcorrer do ciclo menstrual, sendo mais elevados na fases pré-menstrual e menstrual, do que nas fases proliferativa e secretória inicial (Economos *et al.*, 1992). Além disso, as ETs podem estimular a formação dos hormônios esteroidais sexuais pelo ovário (Usuki *et al.*, 1991), e de diversos hormônios hipofisários, como hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Calogero *et al.*, 1994; Vierhapper *et al.*, 1995), GnRH (Stojkovic *et al.*, 1990), LH, FSH e o hormônio estimulador da tireóide (TSH)

(Kanyicska *et al.*, 1991). No entanto, a ET-1 pode inibir a liberação de prolactina (Samson *et al.*, 1990; para mais detalhes ver Wolff, 1996).

1.2. Ocitocina

A OT é um peptídeo neurohipofisário com potentes ações uterotrópicas que vem sendo utilizado, há muito tempo, para a indução do trabalho de parto em humanos. Tanto em ratas quanto em humanos, a OT, a exemplo da vasopressina (VP), é expressa em sítios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos, principalmente em final de gestação e pós-parto, ambas sendo sintetizadas por neurônios distintos dos núcleos para-ventriculares e supra-óptico (George, 1978; Cardwell *et al.*, 1987). No transporte através dos neurônios, a OT associa-se à neurofisina I, enquanto que a VP liga-se à neurofisina II (Diericks e Vandesande, 1979). Como o estradiol aumenta a expressão da neurofisina I, mas não da neurofisina II, a disponibilidade de OT para neurosecreção é aumentada seletivamente ao final da gestação (Pedroza e Rosher, 1975; Robinson, 1975).

Embora a OT também apresente afinidade por receptores vasopressinérgicos V_1 e V_2 , seus potentes efeitos contráteis no útero são mediados por receptores ocitocinérgicos específicos (Maggi *et al.*, 1990; Liggins e Thornburn, 1994; MacDonald, 1993), que foram clonados recentemente (Kimura *et al.*, 1994). As contrações uterinas induzidas pela VP são menores do que as produzidas pela OT e, além disso, a expressão de receptores V_1 permanece inalterada durante o final de gestação ou no útero a termo (Maggi *et al.*, 1990; Tence *et al.*, 1990; Brinner *et al.*, 1992). Ao contrário, a expressão de receptores ocitocinérgicos, em todos os tecidos uterinos, é modulada positivamente na presença de estrogênio (Maggi *et al.*, 1991).

A exemplo das ETs, os efeitos contráteis da OT no miométrio são consequência da ativação da PLC, induzindo a geração de IP_3 , DAG e o aumento dos níveis citosólicos de cálcio por mobilização de depósitos reticulares ou influxo do íon através de canais dependentes de voltagem do tipo L (Tasaka *et al.*, 1991; Thornton *et al.*, 1992; Molnár e Hertelendy, 1995). Além disso, a OT também estimula, direta ou indiretamente, a produção de prostanóides no útero humano (Fuchs *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1988), ou de primatas (Schrey *et al.*, 1988), suínos (Whiteaker *et al.*, 1994), coelhos (Riemer *et al.*, 1986) e ratos (Chan *et al.*, 1993; Molnár e Hertelendy, 1995). Outros aspectos importantes a serem considerados são o sinergismo entre os efeitos contráteis da OT e da ET-1 no útero humano (Maggi *et al.*, 1993), bem como a capacidade da OT estimular a produção de ET-1 por células endometriais cultivadas de coelho (Economos *et al.*, 1992). Por outro lado, parece que a expressão dos receptores para OT é facilitada pelas prostaglandinas, efeito provavelmente dependente do endométrio ou decídua em várias espécies, inclusive em ratas (Chan, 1987).

Os níveis plasmáticos de OT geralmente elevam-se ao final da gestação e mais ainda por ocasião do parto, mas voltam a reduzir-se no período imediatamente após o parto (Dawood *et al.*, 1978, 1979). Foi observado que, em várias espécies, a sensibilidade do miométrio à OT aumenta nas fases finais da gestação ou próximo ao termo, em parte devido ao aumento da expressão de receptores ocitocinérgicos. Tais ocorrências foram registradas em humanos (Fuchs *et al.*, 1984; Garfield e Beier, 1989; Kimura *et al.*, 1992), ratos (Garfield e Beier, 1989; Chan e Chen, 1992; Izumi *et al.*, 1995), cobaias (Alexandrova e Soloff, 1980) e coelhos (Riemer *et al.*, 1986). Por outro lado, a OT produz um efeito relaxante na porção cervical do

miotétrio caprino que pode contribuir para a molificação (ou amadurecimento) cervical que facilita a passagem fetal no parto (Khalifa *et al.*, 1992). Embora a OT pareça exercer, pelo menos, um importante papel facilitatório na expulsão fetal, ainda há controvérsias quanto à real importância dela como deflagrador fisiológico do trabalho de parto, pois a ausência do hormônio retarda, mas não abole, esse processo (Gorodeski *et al.*, 1990; Word *et al.*, 1992).

1.3. Prostaglandinas

As prostaglandinas, bem como o prostanóide tromboxano A_2 , são formados, por ação seqüencial da ciclo-oxigenase e de diferentes isomerases, a partir do ácido araquidônico liberado de fosfolípidos da membrana celular por ativação da PLA_2 (para revisão ver Coleman *et al.*, 1994). Esses compostos incluem os endoperóxidos, a prostaciclina (PGI_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina D_2 (PGD_2) e o tromboxano A_2 (TXA_2). Os prostanóides não devem ser confundidos com outros eicosanóides derivados do ácido araquidônico, os leucotrienos, pois esses últimos são formados pela via das lipo-oxigenases e atuam através de outros tipos de receptores (Borgeat e Samuelsson, 1979).

Os prostanóides são produzidos amplamente por todos os tecidos onde parecem desempenhar múltiplas funções fisiológicas e, por vezes, fisiopatológicas importantes, atuando como hormônios de ação local ou autacóides. Tais ações são mediadas pela ativação de diversos tipos de receptores acoplados a proteínas G, que foram classificados em DP, EP (sub-tipos EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4), FP, IP e TP (para revisão ver Coleman *et al.*, 1994). Esses receptores apresentam maior afinidade para PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_2 , respectivamente, mas a

especificidade de qualquer um deles é limitada. Os receptores DP, EP₂ e IP são acoplados positivamente à adenilato ciclase através da proteína Gs, enquanto que o receptor EP₃ regula negativamente a atividade dessa enzima através da proteína Gi. Por outro lado o receptor EP₃ pode ainda, a exemplo dos receptores FP, TP e talvez EP₁, estimular a PLC através do acoplamento à membros da família de proteínas Gq.

As prostaglandinas mais abundantes no útero da maioria das espécies são a PGF_{2α} e PGE₂ (Goldberg e Ramwell, 1977), enquanto que entre os diversos receptores para prostanóides, os de maior expressão no útero são o EP₃ (Sugimoto *et al.*, 1992) e o FP (Whalley e White, 1980). Porém, esse órgão também apresenta receptores DP, EP₁, EP₂ e TP em várias espécies inclusive a humana (Senior *et al.*, 1992) e ovina (Crankshaw e Gaspar, 1995), além do receptor EP₄, pelo menos no útero de hamster (Yeardley *et al.*, 1992). Diante disso, atuando em receptores FP e EP₃ (e em menor grau EP₁), a PGF_{2α} e a PGE₂ são potentes agonistas contráteis do miométrio em várias espécies, inclusive em ratos (Takayama, 1986). O mecanismo celular parece ser mediado, principalmente, por influxo de cálcio através de canais dependentes de voltagem do tipo L, subsequente à ativação da PLC (Molnár e Hertelendy, 1995). Por outro lado, possivelmente por ativação de receptores EP₂ e estimulação da adenilato ciclase, a PGE₂ pode relaxar porções cervicais ou do istmo do miométrio ovino (Crankshaw e Gaspar, 1995) ou humano (Wikland *et al.*, 1984; Bryman *et al.*, 1986).

As prostaglandinas ainda exercem um papel fisiológico muito importante na fertilidade, atuando em nível de ovário. Nesse sentido, é através do aumento da síntese de prostaglandinas que o LH e o FSH finalizam a etapa da ruptura dos

folículos ovarianos e a liberação do oócito maduro em várias espécies, incluindo coelhos, ratos, suínos e humanos, entre outras (DeWitt, 1990). Esse efeito luteotrópico é induzido por ativação da adenilato ciclase e aumento dos níveis de AMPc pela PGI_2 , PGD_2 e PGE_2 (Hahlin *et al.*, 1988; Bennegård *et al.*, 1990). Por outro lado, a $PGF_{2\alpha}$ parece exercer efeito luteolítico (ou luteólise) em várias espécies como, por exemplo, ratos (Norjavaara e Rosberg, 1986), bovinos (Milvae, 1986), ovinos (Watkins e Moore, 1987) e cobaia (Evans, 1987). Em cabras, a luteólise parece envolver uma ação sinérgica entre a $PGF_{2\alpha}$ e a OT (Cooke e Homeida, 1984). Porém, embora o corpo lúteo de humanos também apresente receptores FP, a $PGF_{2\alpha}$ não parece ser muito efetiva em ocasionar luteólise em nossa espécie (Coleman *et al.*, 1994).

Apesar das prostaglandinas PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ serem utilizadas para induzir aborto, inclusive em humanos, e de inibidores de síntese de prostaglandinas serem efetivos na prevenção de parto prematuro, ainda há dúvidas quanto ao real papel fisiológico desses compostos no trabalho de parto (Wolff, 1996). Contudo, durante o parto, há um aumento da síntese de prostaglandinas no útero, que é influenciada principalmente pelas alterações hormonais fetais em bovinos (Zdunczyk e Janowski, 1989) e nos vários tecidos adjacentes ao miométrio em ovinos (Thornburn *et al.*, 1988). Finalmente, é interessante salientar que vários mediadores capazes de contrair o miométrio também estimulam a síntese de prostaglandinas no útero ou nos tecidos adjacentes a ele, como, entre outros, histamina, bradicinina, angiotensina, citocinas, OT e ET-1 (Chan *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 1992; Peri *et al.*, 1992; para revisão ver De Witt, 1991).

1.4. Variações segmentares da reatividade do miométrio a agonistas contráteis

A maioria dos trabalhos normalmente não distingue se o miométrio, em várias espécies, apresenta diferenças segmentares de reatividade a diferentes agentes miotrópicos. No entanto, alguns estudos têm revelado que a sensibilidade do miométrio humano a agonistas contráteis (ou a distribuição de receptores para esses agentes) é heterogênea. Porções superiores (corpo) são mais sensíveis que as inferiores (istmo ou cérvix) a prostaglandinas (PGs; Wikland *et al.*, 1984) e apresentam maior densidade de receptores para ocitocina (Fuchs *et al.*, 1984) e de RNAm para receptores das endotelinas (Wolff *et al.*, 1996). Porções cervicais de útero isolado de rata prenhe, em final de gestação, são mais sensíveis à OT que as porções ovarianas (Gorodeski *et al.*, 1988; 1990). Esses achados sugerem que diferentes regiões do miométrio apresentam susceptibilidades diferentes às ações modulatórias de hormônios esteroidais. É possível que as variações segmentares da reatividade uterina aos mediadores miotrópicos endógenos sejam relevantes para a fisiologia do trato reprodutivo feminino.

2 - OBJETIVOS

Diante do exposto na Introdução e considerando que a $\text{PGF}_{2\alpha}$, a OT e ET-1 parecem ser os agentes contráteis fisiologicamente mais relevantes no útero de mamíferos, o presente trabalho teve por objetivos:

1. Investigar a reatividade de diferentes porções do miométrio uterino isolado de rata não-prenhe e prenhe de 12 ou de 21 dias à ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$.
2. Determinar o papel exercido pelos prostanóides endógenos nas contrações induzidas por ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ no útero isolado de rata não-prenhe ou prenhe de 12 ou de 21 dias, através da análise da influência de inibidores de ciclo-oxigenase e da dexametasona sobre a reatividade de diferentes porções do miométrio a esses agonistas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar virgens, pesando entre 180 a 250 g, bem como ratas prenhes, pesando entre 250 a 350 g, criadas pelo Biotério Central da UFSC e mantidas no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (6 a 10 por gaiola) em um ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. As ratas virgens (não-prenhes; NP) receberam tratamento com benzoato de 17- β -estradiol ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, por via intraperitoneal) 24 h antes dos experimentos. O procedimento adotado para obtenção de ratas prenhes consistiu do agrupamento de 7 ratas virgens juntamente com 3 ratos machos apenas por uma noite. Somente as ratas que ficaram efetivamente prenhes foram utilizadas para os experimentos, sendo sacrificadas no décimo-segundo dia (meio de prenhez; MP) ou no vigésimo-primeiro dia de gestação (final de prenhez; FP).

3.2. Isolamento e montagem das preparações de útero de rata

Após o sacrifício do animal, por um golpe na nuca e posterior deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta para o isolamento dos dois cornos uterinos, juntamente com o ovário, que foram colocados numa placa de Petri contendo solução de De Jalon modificada (37°C, ver composição abaixo). Após a remoção dos excessos de tecidos adiposo e conjuntivo, cada corno foi dividido em duas metades que foram cuidadosamente separadas e identificadas como porções próximas ao ovário (ou proximais, PO) e porções próximas ao cérvix (ou distais,

PC). Cada porção, medindo em torno de 1,5 cm de comprimento, foi transferida para uma cuba contendo 5 ml de solução de De Jalon modificada, à 37°C, borbulhada com ar. A solução de De Jalon utilizada no presente estudo teve a seguinte composição (em mM): NaCl 154; KCl 5,6; CaCl₂.2H₂O 1,0; MgCl₂.6H₂O 1,4; NaHCO₃ 1,7 e glicose 5,5 (pH 7,2 - 7,4). Através de linhas de sutura, uma das extremidades da preparação foi fixada numa haste de vidro no fundo da cuba, e a outra foi conectada a uma alavanca inscritora com ampliação de 6 vezes, para o registro de contrações isotônicas em um quimógrafo, sob carga de 1 g.

Devido à hipertrofia que ocorre no útero de ratas MP ou FP, as preparações obtidas desses animais não corresponderam exatamente às metades PO e PC. Nesses casos, as preparações foram cortadas de cada uma dessas porções no comprimento aproximado de 1,5 cm. Não foi possível remover os implantes fetais de preparações MP sem comprometer a sua reatividade ao KCl (80 mM, ver abaixo). No entanto, no útero FP os fetos e unidades placentárias foram cuidadosamente removidos antes da obtenção de preparações PO e PC, preferencialmente (quando possível) de segmentos situados entre duas regiões adjacentes de implante feto-placentário.

3.3. Protocolos experimentais

Foi estabelecido um período para estabilização da preparação, aproximadamente 60 min, durante o qual a solução foi renovada a cada 15 min. Decorrido esse período, todas as preparações uterinas foram expostas ao KCl (80 mM, substituindo-se o NaCl por KCl na solução fisiológica), com o objetivo de se obter uma resposta padrão contra a qual as respostas aos demais agonistas foram

comparadas. Após a estabilização da resposta contrátil sustentada ao KCl 80 mM, cada preparação foi lavada por três vezes sucessivas com solução fisiológica normal e estabilizada, novamente, nessa solução por mais 30 min antes de quaisquer novas intervenções farmacológicas. Todas as respostas contráteis da preparação a outros agonistas foram calculadas em relação à resposta obtida ao KCl 80 mM, tomando essa última como 100%.

3.3.1. Curvas concentração-efeito à ET-1, OT ou PGF_{2α} em preparações PO ou PC do útero de rata não-prenhe ou prenhe

Após a estabilização da resposta ao KCl (80 mM), as preparações foram lavadas e aguardou-se por pelo menos 30 min o retorno do tono ao nível basal. Em seguida, foi obtida uma única curva concentração-efeito (CCE) cumulativa à ET-1 (0,1 - 100 nM) ou à OT (0,1 - 300 nM), ou uma CCE não-cumulativa à PGF_{2α} (1 - 1000 nM) em preparações de útero NP, MP e FP. Nas CCEs à ET-1 ou OT, cada concentração só foi adicionada após estabilização da resposta à concentração precedente. No caso da CCE à PGF_{2α}, cada concentração foi adicionada ao banho por 1 a 2 min, seguido de três renovações sucessivas da solução, e obedeceu-se a um intervalo de 15 a 20 min entre cada adição. A sensibilidade de cada preparação uterina aos agonistas foi avaliada em nível da CE₅₀ (i.e. a concentração molar do agonista que causa 50% do efeito máximo do próprio agonista).

3.3.2. Influência de inibidores de ciclo-oxigenase sobre as contrações induzidas por ET-1, OT ou PGF_{2 α} em preparações PO ou PC do útero de rata não-prenhe ou prenhe

Na tentativa de elucidar a possível participação de prostanóides na mediação dos efeitos contráteis da ET-1, OT e PGF_{2 α} no útero isolado de rata, foram realizados novos experimentos na ausência e na presença de indometacina (5,6 μ M), um inibidor da ciclo-oxigenase (COX). Nesses experimentos, imediatamente após as lavagens que se seguiram à exposição ao KCl (80 mM), a indometacina (ou o veículo usado para dissolvê-la) foi adicionada à cuba onde permaneceu por 30 min antes de obter-se uma CCE à ET-1 (0,1 - 100 nM), OT (0,1 - 300 nM) e PGF_{2 α} (1 - 1000 nM) na sua presença. Foram realizados experimentos desse tipo com preparações PO e PC de útero de rata NP, MP e FP. Experimentos semelhantes a esses foram conduzidos para avaliar a influência de outros dois inibidores da COX, o ibuprofeno (10 μ M) e o piroxicam (5 μ M) e de dexametasona (1 μ M), apenas sobre a reatividade do útero FP à ET-1. Nesse caso, ambos os inibidores de COX foram incubados 30 min antes da obtenção de uma CCE à ET-1 na sua presença.

Em outro grupo adicional de experimentos, ratas prenhes de 19 dias foram tratadas previamente com dexametasona (0,35 mg/kg/dia, por via intraperitoneal) ou com indometacina (3 mg/kg/dia, por via intraperitoneal), 48 e 24 h antes do seu sacrifício (no 21º dia) para testar a reatividade da preparação uterina *in vitro* à ET-1, na ausência ou presença de indometacina (5,6 μ M). Em todos os experimentos que fizeram uso de inibidores de COX *in vitro*, as preparações controle foram expostas apenas ao veículo usado para dissolvê-los (concentração final de etanol na cuba 0,1%).

3.4. Drogas e soluções empregadas

As seguintes drogas foram utilizadas: endotelina-1 humana (American Peptides, EUA), ocitocina (Syntocinon[®], Sandoz, Brasil), prostaglandina F_{2α}, benzoato de 17-β-estradiol, dexametasona, ibuprofeno, indometacina e piroxicam (todas da Sigma, EUA). As soluções estoque de ET-1 e PGF_{2α} foram preparadas com tampão fosfato e estocadas à -18 °C, nas concentrações de 10 μM e 1 mM, respectivamente. A ocitocina (40 UI) foi estocada à 4°C. Todos os agonistas foram diluídos às concentrações desejadas com tampão fosfato imediatamente antes do uso. O benzoato de 17-β-estradiol foi dissolvido em 5% de álcool isopropílico em óleo de amendoim na concentração de 1 mg/ml. A dexametasona foi diluída em 5% de álcool em salina. As drogas inibidoras da ciclo-oxigenase, ibuprofeno, indometacina e piroxicam foram dissolvidas em etanol absoluto e diluídas em solução de De Jalon imediatamente antes do uso nas concentrações descritas acima.

3.5. Apresentação dos resultados e análise estatística

Em todas as preparações isoladas de útero, a adição de concentrações crescentes de cada um dos agonistas causou tanto um aumento da frequência das contrações espontâneas, quanto contrações relativamente sustentadas. Apenas essas últimas foram objetivamente quantificadas no presente estudo. Essas respostas são apresentadas como média ± erro padrão da média (E.P.M.), relativas à resposta induzida pelo KCl (80 mM). As CE₅₀s são apresentadas como a média geométrica da concentração molar do agonista que produz 50% do efeito máximo em experimentos individuais, acompanhadas dos respectivos limites de confiança

para 95% (Fleming *et al.*, 1972). Os resultados obtidos em nossos experimentos foram analisados estatisticamente de formas diferentes, conforme a situação: a) através da aplicação do teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas; ou b) em alguns casos, através de Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste "post hoc" de Student-Newman-Keuls (Snedecor e Cochran, 1967). As diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Observações gerais

Não foram observadas diferenças significativas de reatividade ao KCl (80 mM) entre preparações PO e PC em quaisquer das condições NP, MP ou FP (resultados não apresentados). Entretanto, houve uma redução discreta, porém significativa, da reatividade das preparações obtidas de animais na condição MP ou FP ao KCl, quando comparadas com a de preparações na condição NP (resultados não apresentados). Provavelmente, tais diferenças deveram-se ao fato das preparações MP e FP, ao contrário das NP, corresponderem a menos da metade do corno uterino.

A adição de concentrações crescentes e cumulativas de ET-1 (0,1 - 100 nM) ou OT (0,1 - 300 nM), ou não-cumulativas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 - 1000 nM) causou contrações tônicas (ou sustentadas) em preparações de útero isolado de rata NP, MP ou FP. Além disso, cada um dos agonistas também aumentou a frequência das contrações espontâneas dessas preparações em todos os grupos, conforme ilustram os registros típicos apresentados na **Figura 1**, obtidos em preparações PC na condição NP. As respostas tônicas desencadeadas pela ET-1 e OT foram mais persistentes e, geralmente (mas nem sempre), mais pronunciadas do que as respostas induzidas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ (**Figura 1**), além de serem muito mais resistentes à reversão após remoção do agonista (resultados não apresentados).

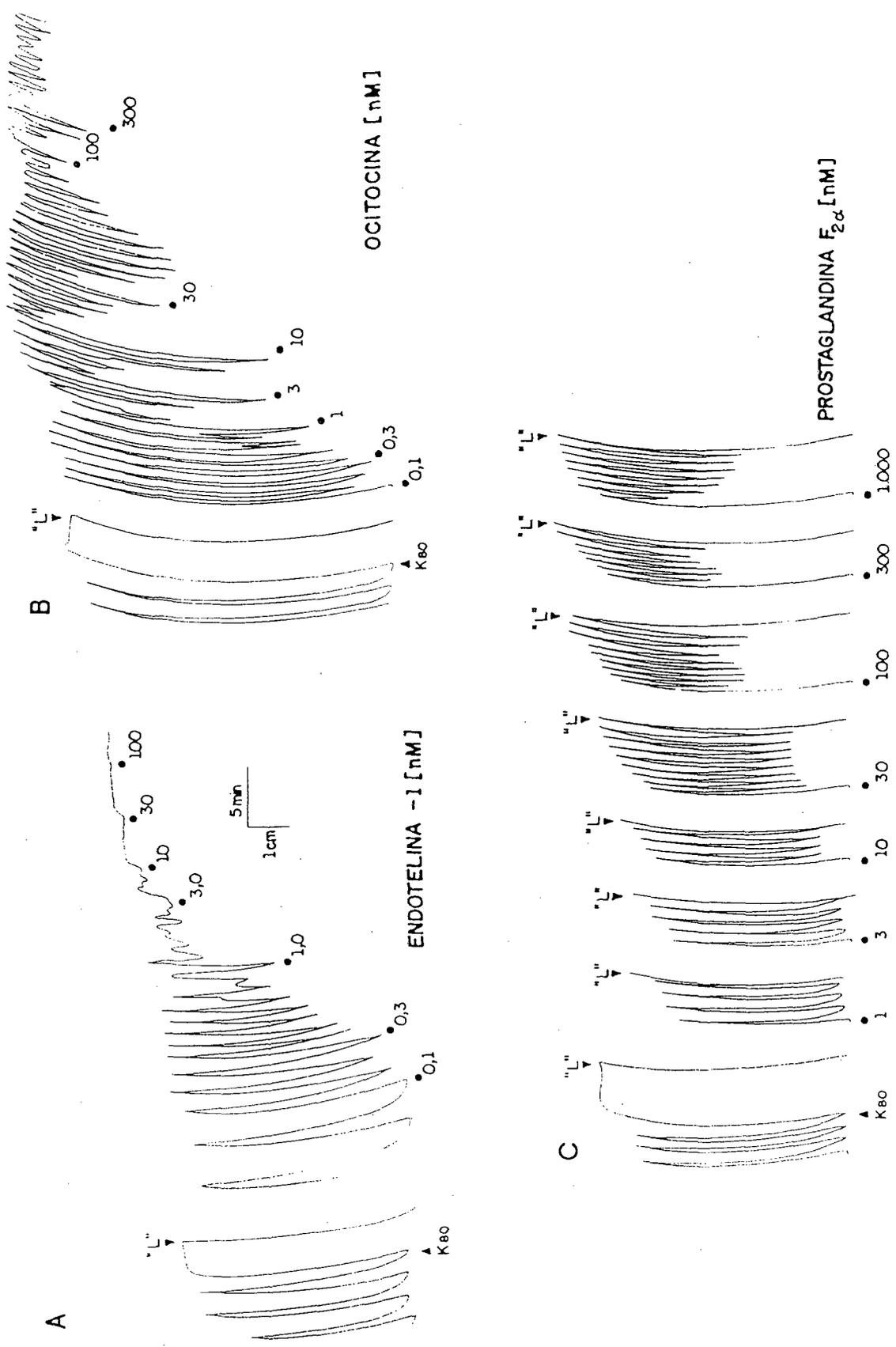


FIGURA 1 - Registro isotônico típico dos efeitos contráteis induzidos pela ENDOTELINA-1 (A), OCITOCINA (B) e PROSTAGLANDINA F_{2α} (C) em porções cervicais de miométrio isolado de rata não-prenhe. "L" indica 3 lavagens sucessivas da preparação com solução de De Jalon Modificada. As barras horizontais e verticais indicam valores de 1 cm da resposta isotônica e 5 minutos de duração do registro, respectivamente.

4.2. Comparação dos efeitos da ET-1, OT ou PGF_{2α} em preparações PO e PC do útero isolado de rata numa mesma condição

Conforme demonstram os dados apresentados na **Figura 2**, as reatividades e sensibilidades (em nível da CE₅₀) de preparações PO e PC à ET-1 não diferiram significativamente, entre si, dentro de qualquer uma das condições fisiológicas (NP, MP ou FP). Os valores de CE₅₀ e de E_{MAX} obtidos em relação à ET-1 em cada preparação estão dispostos na **Tabela 1**.

Em relação à OT, foram detectadas diferenças significativas entre a reatividade de preparações PO e PC a esse agonista nas condições NP e FP (**Figura 3**). Na condição NP, as contrações induzidas pela OT em preparações PO foram maiores que as observadas em preparações PC, enquanto que na condição FP obteve-se o resultado oposto. Já na condição MP, preparações PO mostraram apenas uma tendência próxima ao nível crítico da significância (P = 0,07) de apresentarem um E_{MAX} maior à OT do que as preparações PC. Como indicam os resultados dispostos na **Tabela 2**, nas condições NP ou FP, as diferenças entre a sensibilidade de preparações PO e PC à OT, ao menos em nível da CE₅₀. Porém, na condição MP, a OT foi 4 vezes mais potente em preparações PO que em PC (P < 0,05).

Contrastando com os achados obtidos com a ET-1, as contrações induzidas pela PGF_{2α} nas preparações PO foram significativamente maiores do que as registradas em preparações PC, tanto na condição NP quanto na MP (**Figura 4**). Essas diferenças de reatividade estão associadas a um E_{MAX} maior da preparação PO (particularmente na condição MP). Por outro lado, as CE₅₀s de PGF_{2α} obtidas em preparações PO e PC não diferiram significativamente em qualquer uma das

condições (**Tabela 3**). Não foram detectadas diferenças entre a reatividade de preparações PO e PC à $PGF_{2\alpha}$ na condição FP.

4.3. Comparação dos efeitos da ET-1, OT ou $PGF_{2\alpha}$ no útero isolado de rata em diferentes condições

Comparações dos resultados de preparações de cada uma das porções entre as três condições podem ser visualizadas na **Figura 5**. Verificou-se que na condição MP houve, em relação aos valores observados na condição NP, uma redução significativa do E_{MAX} da ET-1, associada a um aumento discreto mas significativo da sensibilidade ao agonista (de 1,7 vezes em nível da CE_{50}), na preparação PC (**Tabela 1**). Já, na condição FP o E_{MAX} da ET-1 foi significativamente menor em ambos os casos (PO ou PC), e as CE_{50} s apresentaram-se reduzidas em 2,3 e 2,6 vezes, respectivamente, quando comparados aos valores observados na condição NP.

Com relação à OT, observou-se que preparações PO ou PC na condição MP responderam menos às concentrações mais baixas do agonista (0,1 a 1 nM em ambos os casos) do que na condição NP (**Figura 5**). Embora os E_{MAX} s de ambos os grupos tenham sido similares, tanto preparações PO quanto PC apresentaram CE_{50} s reduzidas (2,8 e 7,6 vezes, respectivamente; $P < 0,05$), na condição MP, em relação ao observado na condição NP (**Tabela 2**). Na condição FP, as preparações PO mostraram um decréscimo pronunciado do E_{MAX} da OT, quando comparados aos valores obtidos na condição NP ou MP, associado a redução de 3,5 vezes da CE_{50} ao agonista ($P < 0,05$) em relação à condição MP, mas não à condição NP. Nas preparações PC, por outro lado, os E_{MAX} s da OT em cada uma das três

condições foram semelhantes, mas a condição MP mostrou-se associada a deslocamento significativo da CCE à OT para a direita (de 1,9 e 14,6 vezes em nível da CE_{50}) em relação às condições NP e FP, respectivamente (**Figura 5, Tabela 2**).

Uma comparação análoga revela que as contrações induzidas pela $PGF_{2\alpha}$ em preparações PC foram semelhantes em todas as três condições (**Figura 5**). Além disso, embora o teste de ANOVA tenha acusado uma diferença significativa ($F_{2,10}=4,766; P=0,0352$) entre as CE_{50} s de $PGF_{2\alpha}$ dos grupos PO, o teste estatístico *post-hoc* não detectou diferenças de sensibilidade à $PGF_{2\alpha}$ (em nível da CE_{50}) em quaisquer das condições, tanto entre preparações PO quanto PC (**Tabela 3**). Por outro lado, diferentemente das preparações PC, preparações PO exibiram um aumento pronunciado de respostas à $PGF_{2\alpha}$ na condição MP, quando comparadas àquelas evidenciadas nas condições NP ou FP.

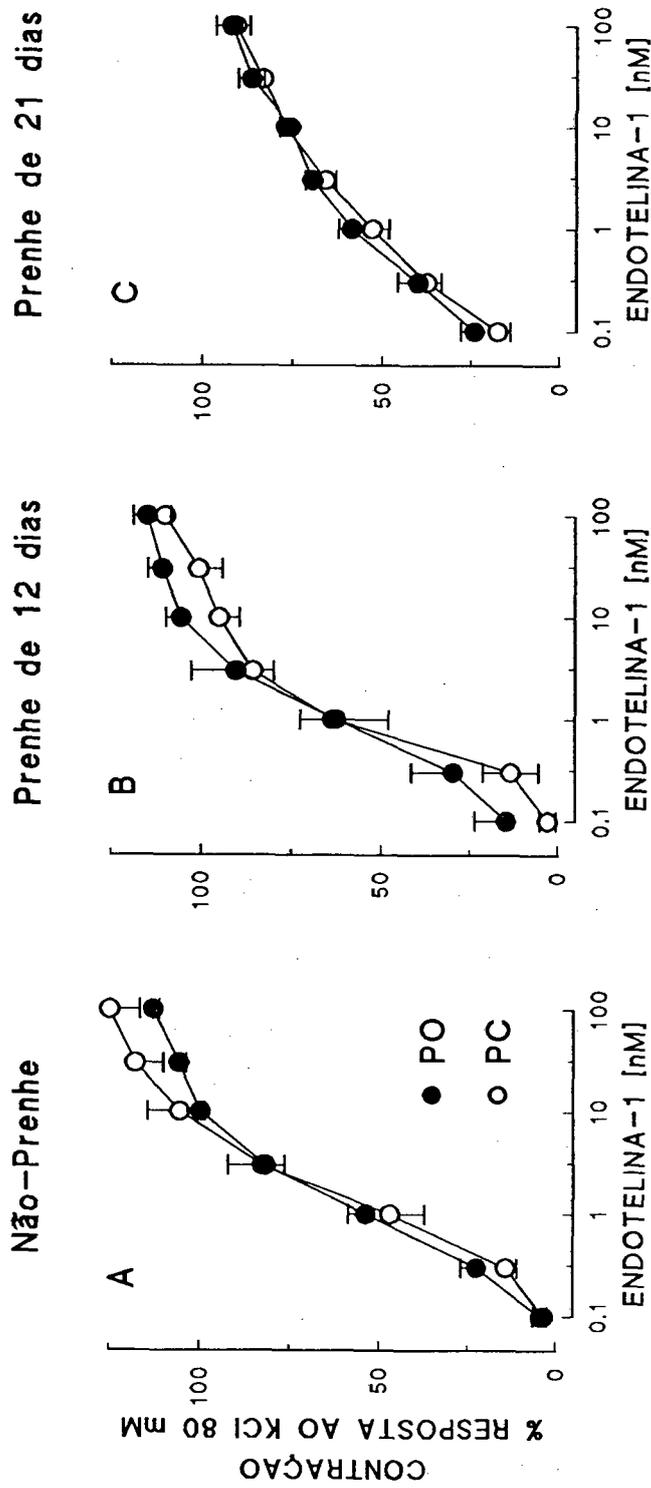


FIGURA 2 - Curvas concentração-efeito à ENDOTELINA-1 em porções ovarianas (●) ou cervicais (○) de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). Cada valor representa a média ± E.P.M de 4 a 5 experimentos, que foram submetidos ao teste "t" bicaudal de Student pareado.

TABELA 1 - Efeitos contráteis da ENDOTELINA-1 em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). As CE₅₀s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O E_{MAX} está expresso como a média ± E.P.M. (em % da resposta ao KCl 80 mM). "N" indica o número de experimentos. ^A indica P < 0,05 quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção (ovariana ou cervical) na condição NG (ANOVA seguido de teste "t" bicaudal de Student-Newman-Keuls). ^B indica P < 0,05 quando comparado ao valor correspondente na preparação da mesma porção (ovariana ou cervical) isolada na condição MG (ANOVA seguido de teste "t" bicaudal de Student-Newman-Keuls). Não houve diferenças significativas entre os valores correspondentes obtidos em preparações das porções ovarianas e cervicais isoladas de ratas numa mesma condição (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas).

CONDIÇÃO	PORÇÃO OVARIANA		PORÇÃO CERVICAL		N
	CE ₅₀ (nM)	E _{MAX}	CE ₅₀ (nM)	E _{MAX}	
Não-Prenhe (NP)	1,13 (0,74-1,73)	113 ± 2	1,46 (0,85-2,52)	125 ± 8	5
Prenhe de 12 dias (MP)	0,83 (0,13-5,27)	115 ± 5	0,86 (0,52-1,44) ^A	110 ± 3 ^A	4
Prenhe de 21 dias (FP)	0,49 (0,11-2,16) ^A	92 ± 4 ^{A,B}	0,56 (0,15-2,15) ^A	91 ± 4 ^{A,B}	4

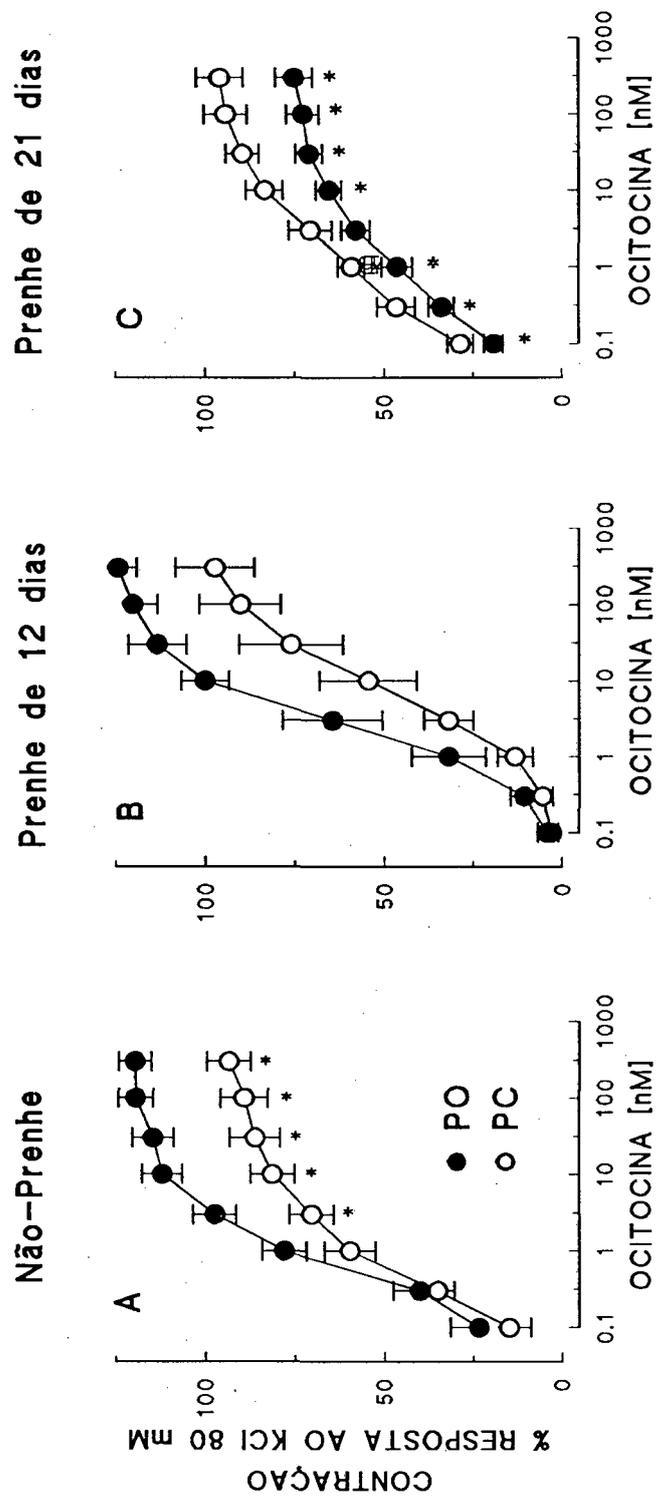


FIGURA 3 - Curvas concentração-efeito à OCITOCINA em porções ovarianas(●) ou cervicais (○) de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). Cada valor representa a média ± E.P.M de 4 experimentos, que foram submetidos ao teste "t" bicaudal de Student pareado e representados por * quando $P < 0,05$.

TABELA 2 - Efeitos contráteis da OCITOCINA em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). As CE_{50} s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O E_{MAX} está expresso como a média \pm E.P.M. (em % de resposta ao KCl 80 mM). "N" indica o número de experimentos. ^A $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da porção cervical na mesma condição (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas). ^B $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção (ovariana ou cervical) na condição NG (ANOVA seguido de teste "t" bicaudal de Student-Newman-Keuls). ^C $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção (ovariana ou cervical) na condição MG (ANOVA seguido de teste "t" bicaudal de Student-Newman-Keuls).

CONDIÇÃO	PORÇÃO OVARIANA		PORÇÃO CERVICAL		N
	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	
Não-Prenhe (NP)	0,55 (0,33-0,94)	120 \pm 5 ^A	0,53 (0,22-1,23)	94 \pm 6	4
Prenhe de 12 dias (MP)	2,27 (0,78-6,56) ^{AB}	124 \pm 5	9,50 (3,98-22,7) ^B	97 \pm 11	4
Prenhe de 21 dias (FP)	0,46 (0,21-1,00) ^C	75 \pm 5 ^{A,B,C}	0,34 (0,19-0,64) ^{B,C}	96 \pm 6	4

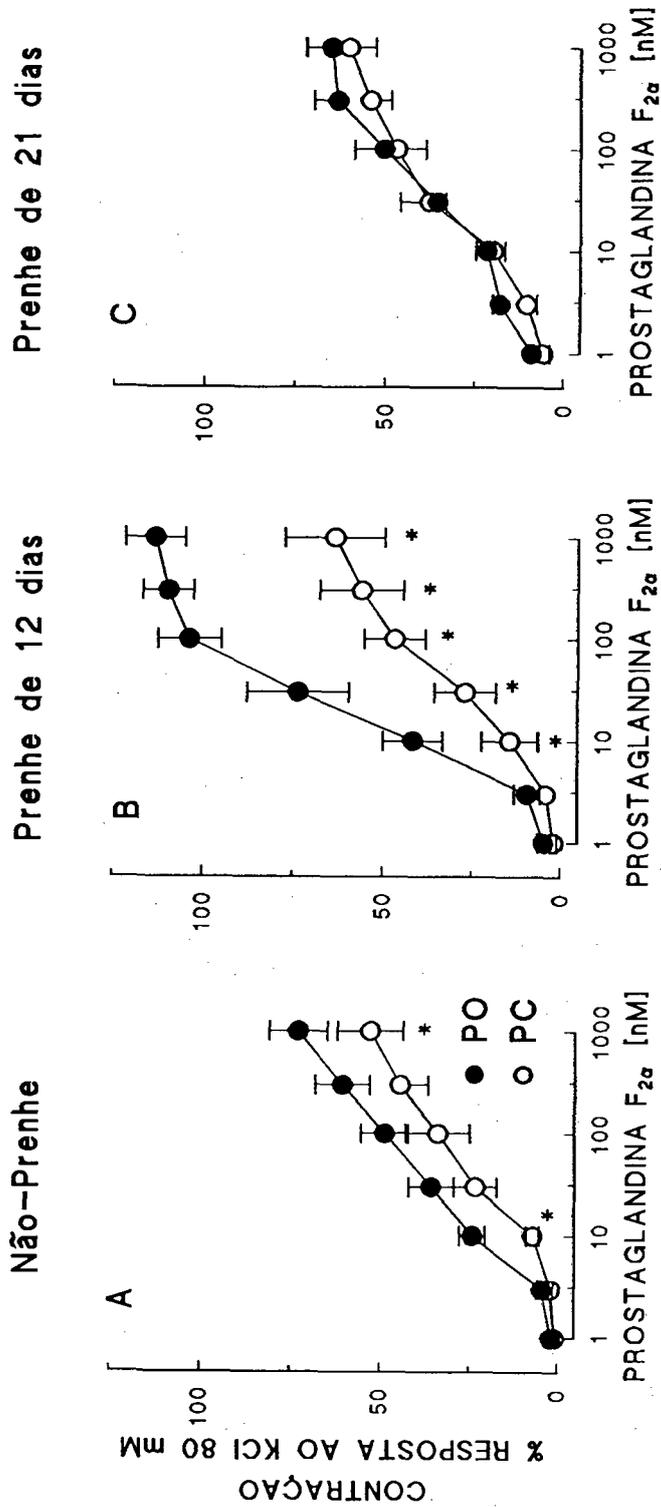
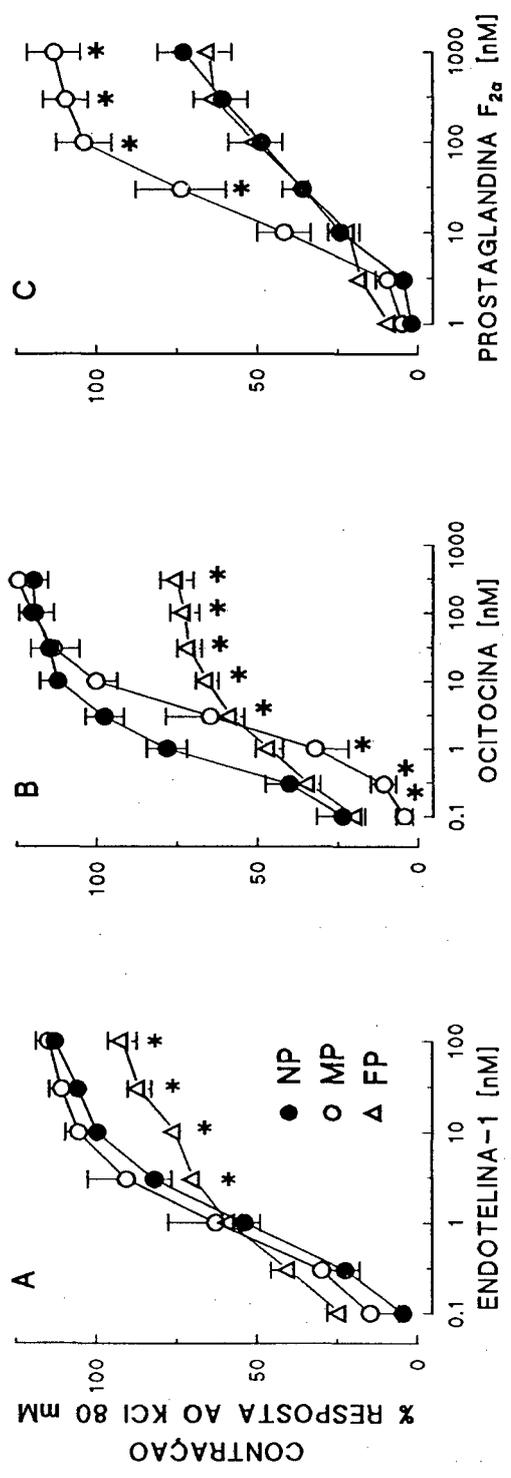


FIGURA 4 - Curvas concentração-efeito à PROSTAGLANDINA F_{2α} em porções ovarianas (●) ou cervicais (○) de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). Cada valor representa a média ± E.P.M de 4 a 5 experimentos, que foram submetidos ao teste "t" bicaudal de Student pareado e representados por * quando P < 0,05.

TABELA 3 - Efeitos contráteis da PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). As CE_{50} s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O E_{MAX} está expresso como a média \pm E.P.M. (em % da resposta ao KCl 80 mM). "N" indica o número de experimentos. ^A $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da porção cervical na mesma condição (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas). ^B $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção (ovariana ou cervical) na condição NG (ANOVA seguido de teste "t" bicaudal de Student-Newman-Keuls). ^C $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção (ovariana ou cervical) na condição MG (ANOVA seguido de teste "t" bicaudal de Student-Newman-Keuls).

CONDIÇÃO	PORÇÃO OVARIANA		PORÇÃO CERVICAL		N
	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	
Não- Prenhe (NP)	30,7 (13,9-67,8)	73 \pm 8 ^A	55,3 (13,9-219,7)	53 \pm 9	4
Prenhe de 12 dias (MP)	15,7 (5,83-42,0)	113 \pm 8 ^{A,B}	38,4 (20,6-71,7)	63 \pm 14	5
Prenhe de 21 dias (FP)	30,7 (6,22-151,7)	65 \pm 7 ^C	26,8 (7,86-91,7)	60 \pm 8	4



PORÇÕES CERVICAIS

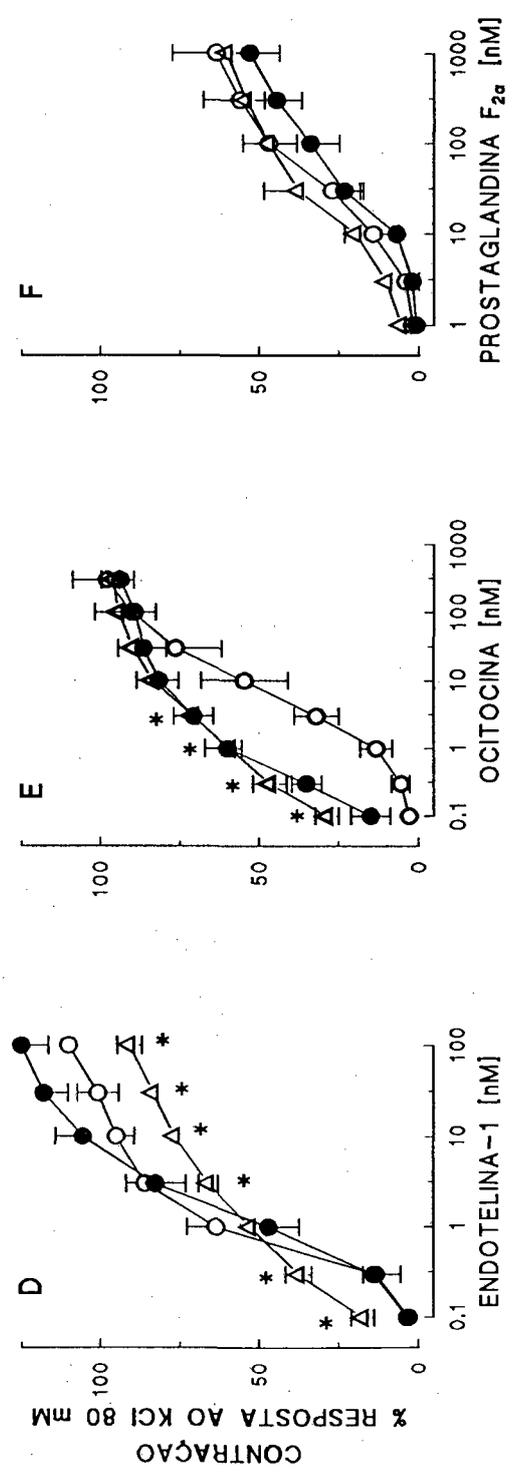


FIGURA 5 - Curvas concentração-efeito à ENDOTELINA-1 (**A** e **D**), OCITOCINA (**B** e **E**) e PROSTAGLANDINA F_{2α} (**C** e **F**) em miométrio de rata não-prenhe (●), prenhe de 12 dias (○) e de 21 dias (△) nas porções ovarianas (**painel superior**) e nas porções cervicais (**painel inferior**). Cada valor representa a média ± E.P.M de 4 a 5 experimentos, que foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste "post hoc" de Student-Newmann-Kuel e representado por * quando P < 0,05.

4.4. Comparação entre os efeitos da ET-1, OT ou PGF_{2α} em preparações PO e PC do útero isolado de rata em diferentes condições

A **Figura 6** ilustra os efeitos contráteis induzidos pela ET-1, OT e PGF_{2α} em segmentos PO ou PC de útero de rata isolado em cada uma das três condições. Verificou-se que a potência da OT nos dois segmentos foi maior que a da ET-1 tanto na condição NP quanto na FP (comparar **Tabelas 1 e 2**). Porém, na condição MP, ambos os agonistas apresentaram-se equipotentes ao nível da CE₅₀ em preparações PO e PC. Já a PGF_{2α} apresentou uma potência menor que a da ET-1 ou OT em todos os casos analisados (comparar **Tabelas 1, 2 e 3**).

A eficácia relativa dos três agonistas em contrair o útero variou consideravelmente, dependendo tanto da porção uterina considerada quanto da condição (comparar **Tabelas 1, 2 e 3**). A ET-1 apresentou um E_{MAX} igual ao da OT em todos os grupos, exceto na preparação PC na condição NP, onde o E_{MAX} da ET-1 foi maior que o da OT. Por outro lado, o grupo PO na condição MP foi o único no qual o E_{MAX} da ET-1 foi igual ao da PGF_{2α}, sendo que nos demais casos o E_{MAX} do prostanóide foi significativamente menor que o da ET-1. Já, ao comparar-se as E_{MAX}s da OT e PGF_{2α}, observou-se que o E_{MAX} da PGF_{2α} foi menor que o da OT em três grupos (PO-NP, PC-MP e PC-FP) e igual nos demais (PO-NP, PO-FP e PC-NP).

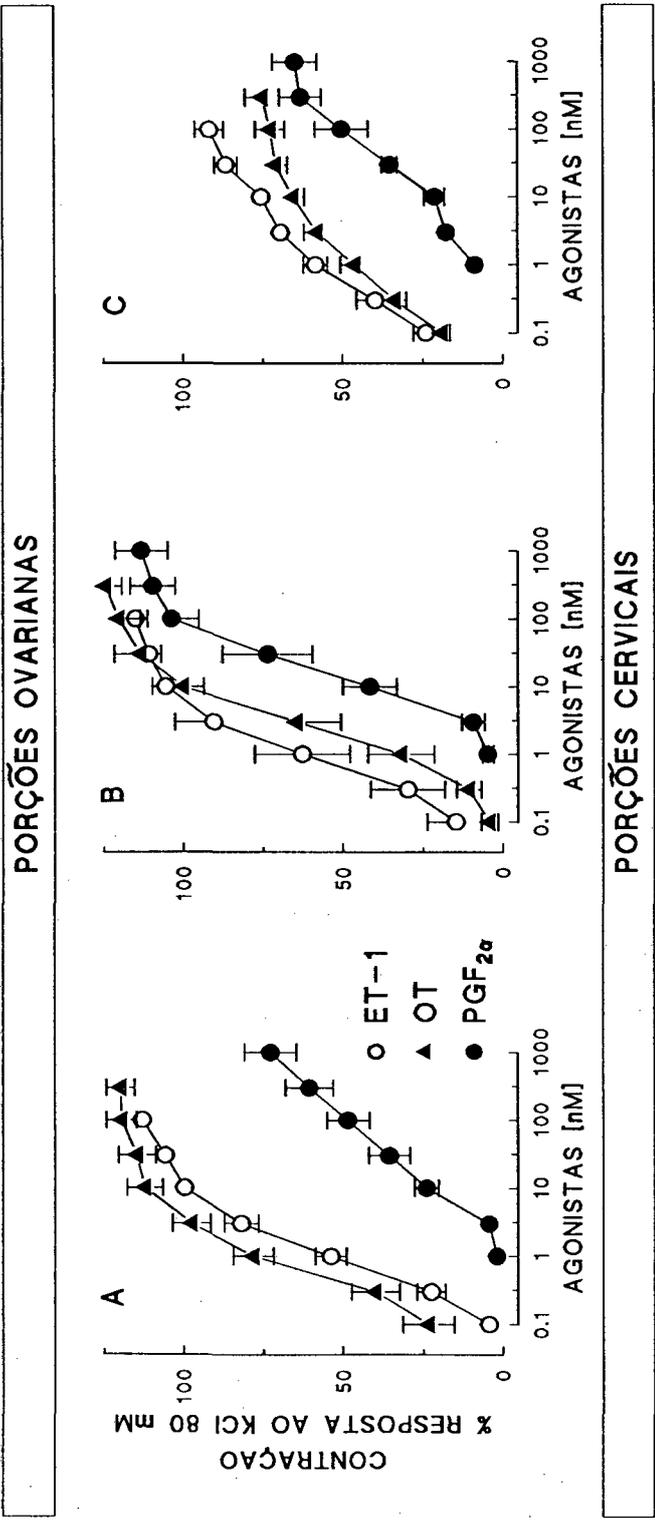


FIGURA 6 - Comparação dos efeitos da ENDOTELINA-1 (O), OCITOCINA (▲) e PROSTAGLANDINA F_{2α} (●) sobre o útero isolado de rata não-prenhe (A e D), prenhe de 12 dias (B e E) e de 21 dias (C e F) nas porções ovarianas (painel superior) e nas porções cervicais (painel inferior). Cada valor representa a média ± E.P.M de 4 a 5 experimentos.

4.5. Influência da indometacina nos efeitos da ET-1, OT ou PGF_{2 α} em preparações PO e PC do útero isolado de rata

A exposição de preparações uterinas PO ou PC ao inibidor de ciclo-oxigenase indometacina (5,6 μ M) inibiu, na maioria das vezes completamente, o desenvolvimento de contrações espontâneas em qualquer das condições (NP, MP ou FP). No entanto, a adição subsequente de ET-1, OT ou PGF_{2 α} prontamente restabeleceu a ocorrência dessas contrações fásicas (resultados não apresentados).

A indometacina não influenciou a reatividade do útero PO ou PC à ET-1 na condição NP (**Figura 7**). Contudo, a indometacina reduziu significativamente as contrações induzidas por concentrações sub-maximamente efetivas de ET-1 nas PC na condição MP e nas PC e PO na condição FP (**Figura 7**). Conforme mostram os resultados dispostos na **Tabela 4**, a indometacina não influenciou o E_{MAX} da ET-1 em quaisquer dos grupos de preparações PO, embora houvesse uma tendência a redução desse parâmetro nas condições MP (P = 0,09) e FP (P = 0,07). Em contraste, o E_{MAX} da ET-1 em preparações PC nas condições MP e FP foi reduzido de modo significativo pela indometacina, que também reduziu a sensibilidade ao peptídeo em preparações PC na condição MP (2 vezes), e de PO (3,4 vezes) na condição FP.

Na condição NP, a indometacina não afetou significativamente a magnitude das contrações induzidas pela OT na preparação PO, exceto para a concentração de 0,06 nM, mas reduziu a CE₅₀ do agonista em 1,8 vezes (**Figura 8 e Tabela 5**). Ao contrário, na preparação PC nessa mesma condição, a indometacina causou um aumento significativo das contrações à OT, inclusive em nível do E_{MAX}, mas não alterou a CE₅₀. De modo geral, nas condições MP e FP, a indometacina influenciou

a reatividade do útero à OT de modo essencialmente semelhante ao verificado com relação à $PGF_{2\alpha}$ (ver abaixo). Assim, na condição MP a indometacina reduziu significativamente as respostas induzidas por concentrações mais elevadas de OT e aumentou a CE_{50} do agonista em 2,8 vezes na preparação PO, mas não afetou a preparação PC (**Figura 8 e Tabela 5**). Finalmente, na condição FP, a indometacina influenciou em sentidos opostos a reatividade de preparações PO e PC à OT, potencializando as respostas da primeira e inibindo as da segunda (**Figura 8 e Tabela 5**). Ainda nessa condição, o inibidor de ciclo-oxigenase reduziu significativamente a sensibilidade de preparações PC (6 vezes em nível da CE_{50}), mas não em preparações PO ($P = 0,09$).

As contrações produzidas pela $PGF_{2\alpha}$ na condição NP foram potencializadas significativamente pela indometacina em preparações PC (mas não em PO), tendo sido observado tanto um aumento do E_{MAX} de 40% quanto uma redução da CE_{50} ao agonista de 8,6 vezes (**Figura 9 e Tabela 6**). Na condição MP, a indometacina não alterou as respostas de preparações PC à $PGF_{2\alpha}$, mas inibiu as contrações das preparações PO induzidas por baixas concentrações do agonista (10 e 30 nM), aumentando a CE_{50} em 4,4 vezes. Uma inibição ainda mais pronunciada da reatividade à $PGF_{2\alpha}$ foi observada na preparação PC durante a condição FP (CE_{50} aumentada em 3,5 vezes). No entanto, ao contrário e surpreendentemente, a indometacina aumentou de modo marcante o E_{MAX} do agonista na preparação PO nessa condição (FP), sem alterar a CE_{50} (**Figura 9 e Tabela 6**).

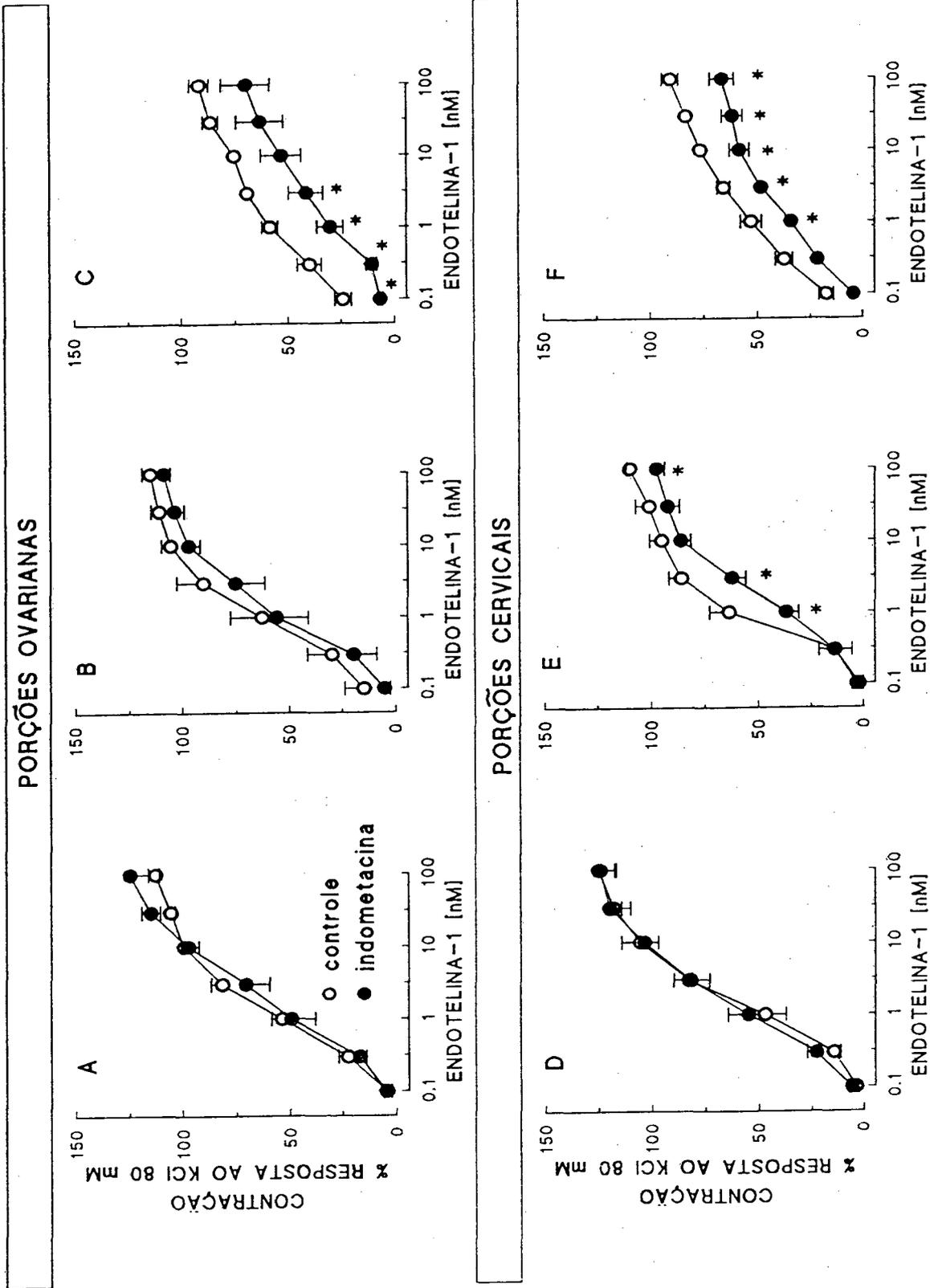
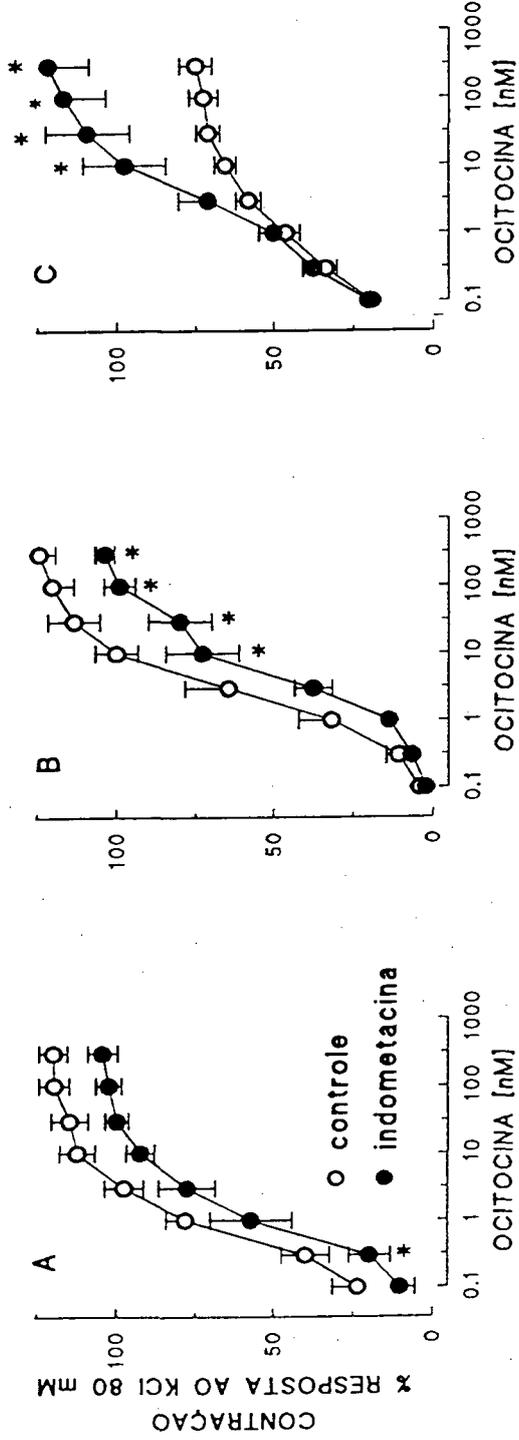


FIGURA 7 - Influência da indometacina, inibidor inespecífico de ciclooxigenase, sobre o efeito da ENDOTELINA-1 em miométrio isolado de rata não-prenhe (A e D), prenhe de 12 dias (B e E) e de 21 dias (C e F) nas porções ovarianas (painel superior) e nas porções cervicais (painel inferior). Cada valor representa a média \pm E.P.M de 4 a 5 experimentos, na ausência (O) ou na presença (●) de 5,6 μ M de indometacina, submetidos ao teste "t" bicaudal de Student pareado e representado por * quando $P < 0,05$.

TABELA 4- Influência da indometacina (5,6 μ M) nos efeitos contráteis da ENDOTELINA-1 em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). As CE_{50} s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O E_{MAX} está expresso como a média \pm E.P.M. (em % da resposta ao KCl 80 mM). "N" indica o número de experimentos. ^A $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção na ausência de indometacina (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas).

CONDIÇÃO	TRATAMENTO	PORÇÃO OVARIANA		PORÇÃO CERVICAL		N
		CE_{50} (nM)	E_{MAX}	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	
Não -Prenhe (NP)	controle	1,13 (0,74-1,73)	113 \pm 2	1,46 (0,85-2,52)	125 \pm 8	5
	Indometacina	1,66 (0,52-5,37)	125 \pm 9	1,39 (0,84-2,30)	124 \pm 7	5
Prenhe 12 dias (MP)	Controle	0,83 (0,13-5,27)	115 \pm 5	0,86 (0,52-1,44)	110 \pm 3	4
	Indometacina	1,00 (0,19-5,30)	108 \pm 3	1,77 (0,82-3,79) ^A	98 \pm 7 ^A	4
Prenhe 21 dias (FP)	Controle	0,49 (0,11-2,16)	92 \pm 4	0,56 (0,15-2,15)	91 \pm 4	4
	Indometacina	1,66 (0,29-9,60) ^A	70 \pm 11	0,94 (0,35-2,51)	67 \pm 8 ^A	4

PORÇÕES OVARIANAS



PORÇÕES CERVICAIS

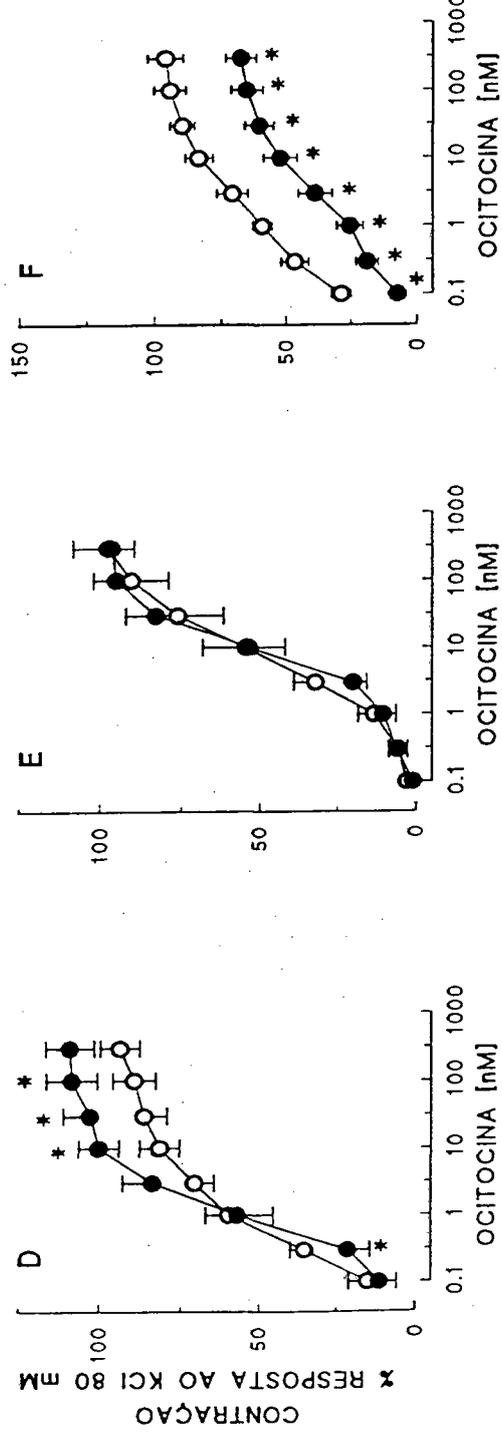
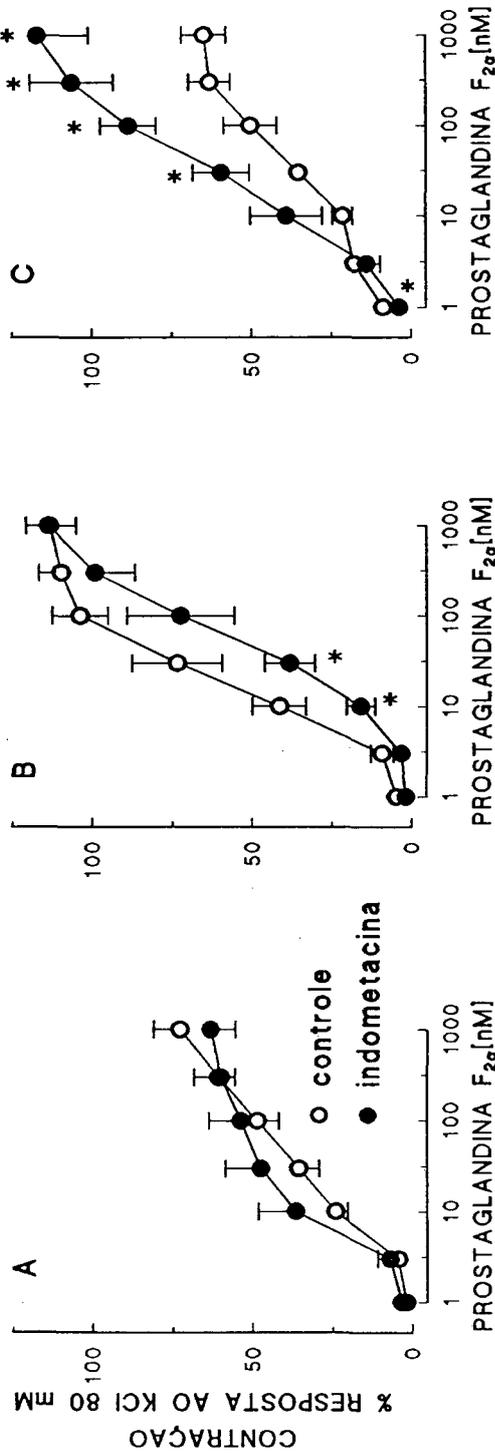


FIGURA 8 - Influência da indometacina, inibidor inespecífico de ciclooxigenase, sobre o efeito da OCITOCINA em miométrio isolado de rata não-prenhe (A e D), prenhe de 12 dias (B e E) e de 21 dias (C e F) nas porções ovarianas (painel superior) e nas porções cervicais (painel inferior). Cada valor representa a média \pm E.P.M de 4 experimentos, na ausência (O) ou na presença (●) de 5,6 μ M de indometacina, submetidos ao teste "t" bicaudal de Student pareado e representado por * quando $P < 0,05$.

TABELA 5- Influência da indometacina (5,6 μ M) nos efeitos contráteis da OCITOCINA em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). As CE_{50} s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O E_{MAX} está expresso como a média \pm E.P.M. (em % da resposta ao KCl 80 mM). "N" indica o número de experimentos.. ^A $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção na ausência de indometacina (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas).

CONDIÇÃO	TRATAMENTO	PORÇÃO OVARIANA		PORÇÃO CERVICAL		N
		CE_{50} (nM)	E_{MAX}	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	
Não-Prenhe (NP)	Controle	0,55 (0,33-0,94)	120 \pm 5	0,53 (0,22-1,23)	94 \pm 6	4
	Indometacina	0,97 (0,38-2,45) ^A	104 \pm 5	0,97(0,35-2,68)	109 \pm 8 ^A	4
Prenhe 12 dias (MP)	Controle	2,27 (0,78-6,56)	124 \pm 5	9,50 (3,98-22,7)	97 \pm 11	4
	Indometacina	6,41 (1,84-22,3) ^A	104 \pm 3 ^A	8,81 (4,34-17,9)	96 \pm 7	4
Prenhe 21 dias (FP)	Controle	0,46 (0,21-1,00)	75 \pm 5	0,34 (0,19-0,64)	96 \pm 6	4
	Indometacina	1,51 (0,28-8,12)	122 \pm 13 ^A	2,11 (0,84-5,26) ^A	67 \pm 6 ^A	4

PORÇÕES OVARIANAS



PORÇÕES CERVICAIS

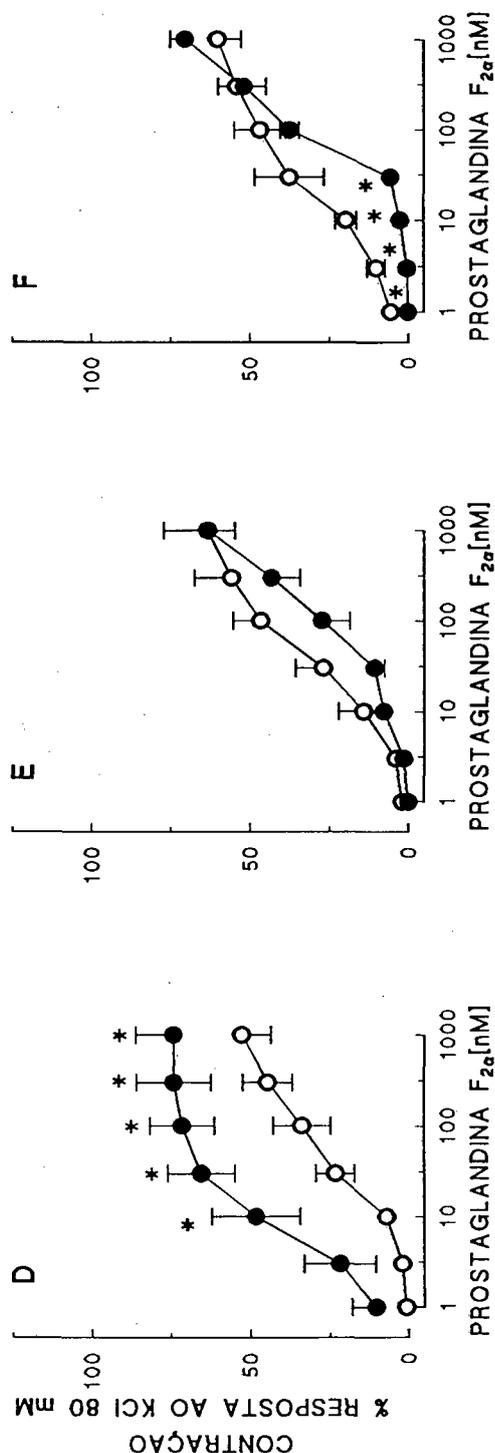


FIGURA 9 - Influência da indometacina, inibidor não-seletivo de cicloxigenase, sobre o efeito da PROSTAGLANDINA F_{2α} em miométrio isolado de rata não-prenhe (B e E), prenhe de 12 dias (C e F) e de 21 dias (A e D), prenhe de 4 a 5 experimentos, na ausência (○) ou na presença (●) de 5,6 μM de indometacina, submetidos ao teste "t" bicaudal de Student pareado e representado por * quando P < 0,05.

TABELA 6- Influência da indometacina (5,6 μ M) nos efeitos contráteis da PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ em porções ovarianas ou cervicais de útero isolado de rata não-prenhe (NP), prenhe de 12 dias (MP) ou de 21 dias (FP). As CE_{50} s estão representadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. O E_{MAX} está expresso como a média \pm E.P.M. (em % da resposta ao KCl 80 mM). "N" indica o número de experimentos.. ^A $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente observado na preparação obtida da mesma porção na ausência de indometacina (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas).

CONDIÇÃO	TRATAMENTO	PORÇÃO OVARIANA		PORÇÃO CERVICAL		N
		CE_{50} (nM)	E_{MAX}	CE_{50} (nM)	E_{MAX}	
Não Prenhe (NP)	Controle	30,7 (13,9-67-8)	73 \pm 8	55,3 (13,9-219,7)	53 \pm 9	4
	Indometacina	10,7 (2,49-46,0)	63 \pm 8	6,43 (2,24-18,5) ^A	74 \pm 12 ^A	4
Prenhe 12 dias (MP)	Controle	15,7 (5,8-42,0)	113 \pm 8	38,4 (20,6-71,7)	63 \pm 14	5
	Indometacina	69,3 (32,2-149,2) ^A	114 \pm 7	94,9 (38,6-233,6)	63 \pm 8	5
Prenhe 21 dias (FP)	Controle	30,7 (6,22- 151,7)	65 \pm 7	26,8 (7,86-91,7)	60 \pm 8	4
	Indometacina	27,8 (15,4-50,3)	117 \pm 16 ^A	93,0 (72,0-120,0) ^A	70 \pm 5	4

4.6. Influência do ibuprofeno, do piroxicam e da dexametasona nas contrações induzidas por ET-1 no útero isolado de rata na condição FP

Como a indometacina inibiu as contrações induzidas pela ET-1 de forma semelhante em ambas as porções do útero na condição FP, não distinguiu-se a porção PC da PO nos experimentos com útero na condição FP descritos a seguir. A exposição ao ibuprofeno (10 μM) induziu uma discreta inibição da reatividade uterina à ET-1, restrita apenas às concentrações baixas do agonista (0,1 e 0,3 nM), sem modificar a CE_{50} ou o E_{MAX} da ET-1 (**Figura 10 e Tabela 7**). No entanto, nas preparações incubadas com piroxicam (5 μM), notou-se uma inibição da reatividade à ET-1 semelhante àquela produzida pela indometacina (5,6 μM) no útero durante o final de gestação. Assim, o piroxicam reduziu as respostas ao longo de toda a CCE, aumentando a CE_{50} em 2 vezes e diminuindo o E_{MAX} em cerca de 26% (**Figura 10 e Tabela 7**). Em contraste, a incubação prévia com dexametasona (1 μM) 30 min antes de iniciar a CCE à ET-1 não influenciou a reatividade uterina ao agonista (**Figura 10 e Tabela 7**).

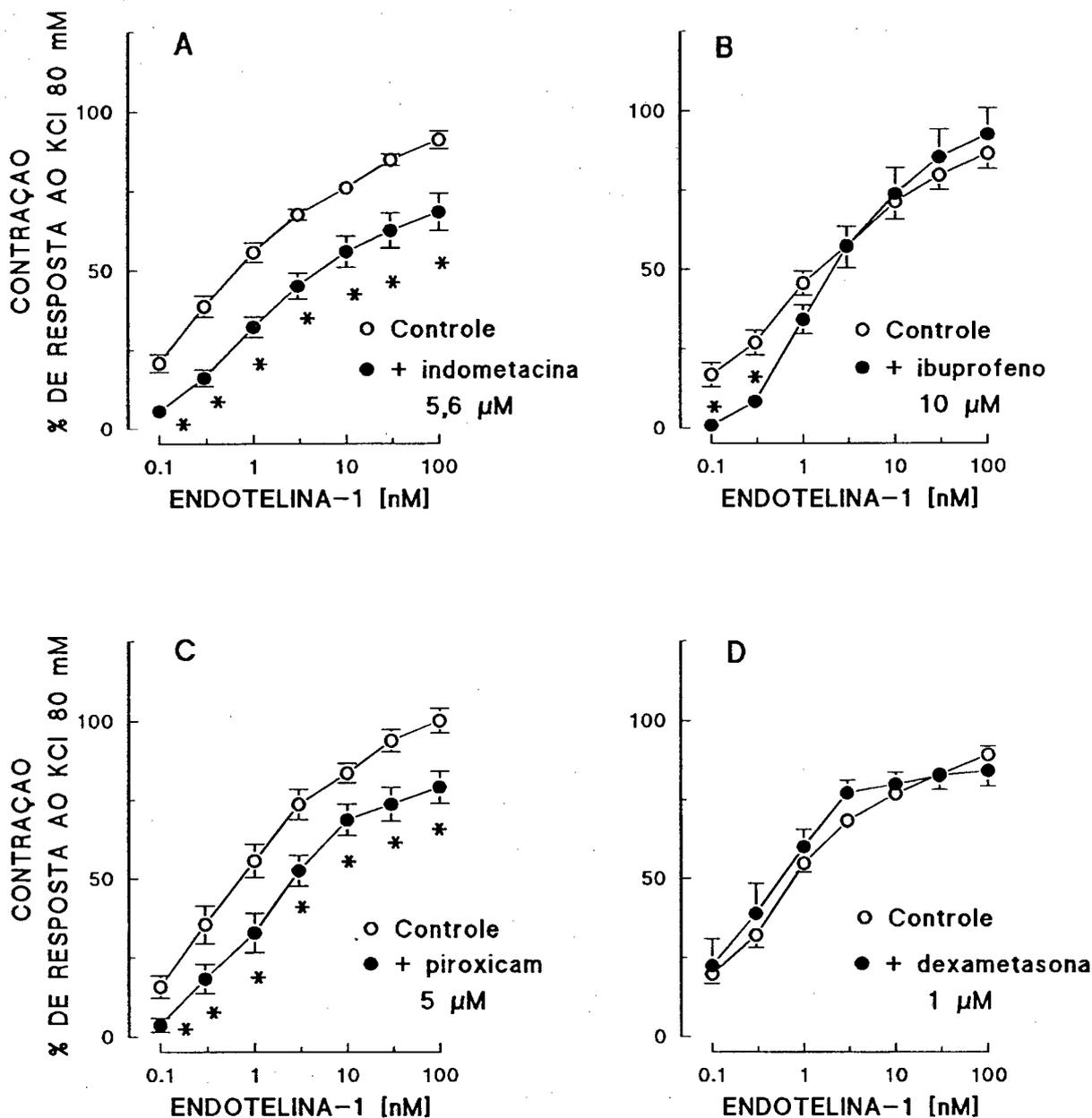


FIGURA 10 - Influência da indometacina (5,6 μ M; **painel A**), ibuprofeno (10 μ M; **painel B**), piroxicam (5 μ M; **painel C**) e dexametasona (1 μ M; **painel D**) sobre o efeito da ENDOTELINA-1 em útero isolado de rata prenhe de 21 dias (FP). Cada valor representa a média \pm E.P.M de 4 a 6 experimentos, na ausência (○) ou na presença (●) de cada droga, adicionada ao banho 30 min antes da exposição à ET-1. Os resultados obtidos foram posteriormente avaliados pelo teste "t" bicaudal de Student pareado e representado por * quando $P < 0,05$.

Tabela 7 - Influência da indometacina (5,6 μ M), ibuprofeno (10 μ M), piroxicam (5 μ M) e dexametasona (1 μ M) nas respostas induzidas por ENDOTELINA-1 no útero isolado de rata em final de prenhez (21 dias). Alguns animais foram tratados com indometacina ou dexametasona 24 e 48 horas antes do sacrifício. Os valores de CE50 representam a média geométrica acompanhada dos limites de confiança para 95%, enquanto os de E_{MAX} são apresentados como a média \pm E.P.M. da resposta, como percentagem da contração induzida por KCl (80 mM). "N" indica o número de experimentos. ^A P < 0.05 em relação ao valor correspondente do respectivo grupo controle (teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas).

IN VIVO	TRATAMENTO		CE ₅₀ (nM)	E _{max}	N
	IN VITRO				
Nenhum	controle		0,52 (0,26-1,04)	91 \pm 3	8
	Indometacina		1,25 (0,60-2,61) ^A	68 \pm 6 ^A	8
	controle		0,96 (0,63-1,45)	87 \pm 5	6
	Ibuprofeno		1,89 (1,13-3,16)	93 \pm 8	6
	controle		0,64 (0,35-1,18)	100 \pm 4	5
	Piroxicam		1,48 (0,89-2,47) ^A	79 \pm 5 ^A	5
	controle		0,20 (0,09-0,62)	82 \pm 2	4
	Dexametasona		0,25 (0,06-0,98)	84 \pm 5	4
Indometacina 3 mg/kg/dia	controle		1,64 (0,99-2,74)	81 \pm 8	4
	Indometacina		0,89 (0,56-1,41)	87 \pm 5	4
Dexametasona 0,35 mg/kg/dia	Controle		0,37 (0,14-0,95)	79 \pm 3	4
	Indometacina		0,57 (0,38-0,85)	97 \pm 6 ^A	4

Em outra série de experimentos, verificamos que o tratamento *in vivo* com dexametasona (0,35 mg/kg/dia, por via intraperitoneal) ou com indometacina (3 mg/kg/dia, por via intraperitoneal), 48 e 24 h antes do sacrifício do animal, aboliu a influência inibitória da indometacina (5,6 μ M) *in vitro* sobre a reatividade uterina à ET-1 (**Figura 11 e Tabela 7**). Inclusive, na preparação proveniente de animais tratados com dexametasona (0,35 mg/kg/dia, por 2 dias), a exposição à indometacina *in vitro* aumentou significativamente as contrações causadas por concentrações mais elevadas de ET-1, bem como o E_{MAX} do agonista. Ao contrário do observado na preparação isolada de ratas não tratadas, onde a indometacina *in vitro* reduziu a CE_{50} da ET-1 em 2,4 vezes, a exposição de preparações provenientes de animais tratados com indometacina ou dexametasona à indometacina *in vitro* não alterou a CE_{50} do agonista (**Tabela 7**).

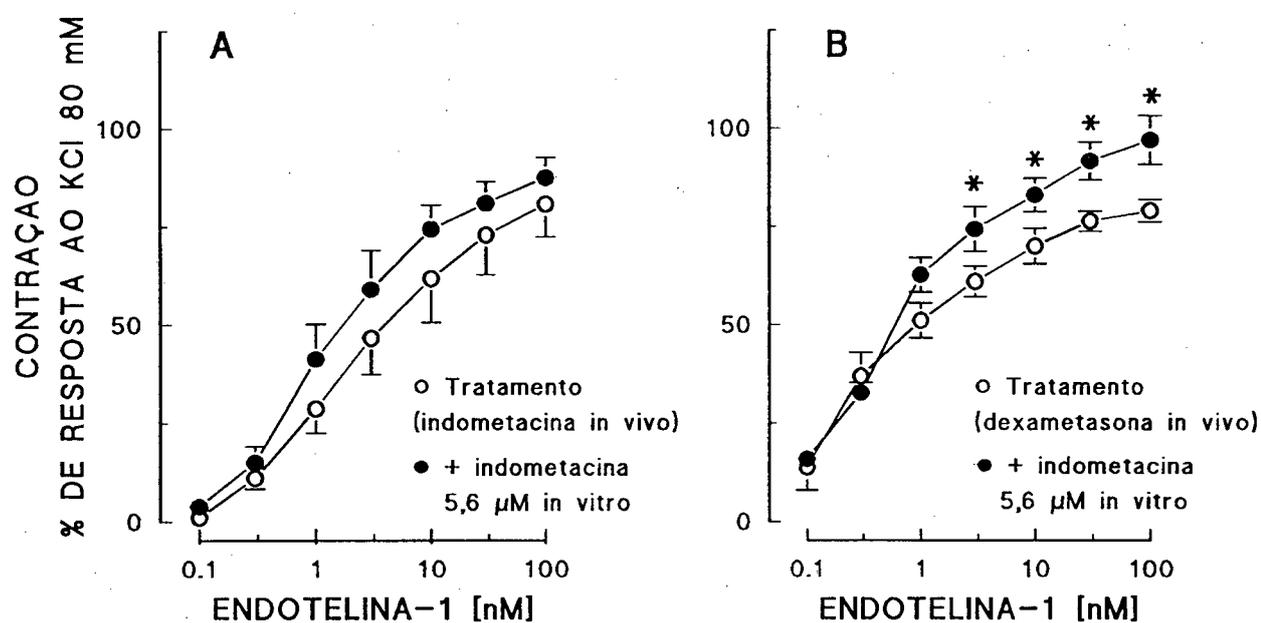


FIGURA 11 - Efeito do tratamento prévio *in vivo*, com indometacina (3 mg/Kg/dia; **painel A**) e dexametasona (0,35 mg/Kg/dia; **painel B**) 48 h e 24 h antes do sacrifício do animal no 21^o dia de prenhez (FP), sobre as respostas induzidas pela ENDOTELINA-1 em experimentos realizados *in vitro* na ausência (O) ou na presença de indometacina (●). Cada valor representa a média \pm E.P.M de 4 experimentos, que foram posteriormente avaliados pelo teste "t" bicaudal de Student pareado e representado por * quando $P < 0,05$.

5 - DISCUSSÃO

Nesse estudo, evidenciamos que a resposta contrátil do útero isolado de rata a diferentes agonistas é influenciada de formas variadas pelo estado hormonal. Além disso, esse tecido apresenta diferenças segmentares importantes quanto à sua reatividade a agonistas, bem como em relação à possível modulação e/ou mediação das respostas por eicosanóides derivados da via das ciclo-oxigenases (prostanóides). Na discussão que ora inicia-se, procuraremos enfocar primeiramente os aspectos segmentares da reatividade uterina à ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$, para depois discorrer sobre o envolvimento de prostanóides nas ações desses agonistas nas diferentes condições hormonais.

5.1. Respostas à ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ das porções ovariana e cervical do útero isolado de rata não-prenhe ou prenhe

5.1.1. Endotelina-1

A ET-1 foi, dentre os agonistas testados nesse trabalho, o que apresentou efeitos contráteis mais semelhantes em preparações PO e PC, em cada uma das três condições testadas. A constatação de que tanto preparações PO, quanto PC, exibiram um aumento de sensibilidade à ET-1 (em nível da CE_{50}) na condição FP confirma estudos prévios, nos quais não se fez distinção entre ambas as porções, em útero de rata (Calixto e Rae, 1991; Sakata e Karaki, 1992; Yallampali e Garfield, 1994) e humano (Word et al., 1990). Há relatos de que, em ratos e coelhos, a densidade de receptores para ET-1 no miométrio (que são, claramente, do tipo ET_A

em ratos, Rae et al., 1993) é reduzida, progressivamente, no transcorrer da maior parte da gestação, mas que ocorre um rápido aumento desses sítios próximo ao termo (Yallampali e Garfield, 1994; Peri et al., 1992). Também há evidências que a densidade de receptores para ET-1 no útero está diretamente relacionada à razão estrógeno/progesterona, que é particularmente elevada próximo ao termo (Maggi et al., 1993). Em humanos, também há aumento da expressão de RNAm para receptores ET_A no corpo do útero próximo ao termo (mas não no istmo), quando comparado a valores observados em tecido não grávido (Wolff et al., 1996). Porém Schiff et al. (1993) e Maggi et al. (1994) não encontraram diferenças entre a densidade de sítios de ligação de ET-1 em membranas de porções não especificadas do miométrio grávido pré-termo, a termo, ou não grávido. Se é verdade que há uma redução progressiva da expressão de receptores ET_A no miométrio de rata ao longo da gestação, talvez ela ocorra antes do 12º dia, pois não detectamos redução da sensibilidade à ET-1 de preparações PO ou PC na condição MP, em relação aos valores observados na condição NP.

A redução do E_{MAX} da ET-1 detectada, em ambas as preparações, na condição FP contrasta com relatos prévios de aumento desse parâmetro no útero de rata próximo ao termo. Talvez a discrepância esteja relacionada ao tipo de atividade contrátil avaliada em cada estudo. Enquanto o presente estudo avaliou apenas a magnitude das contrações isotônicas induzidas pela ET-1, Yallampalli e Garfield (1994) combinaram os efeitos da ET-1 sobre a frequência das contrações isométricas fásicas/espontâneas e sobre o tono, ou seja, utilizaram a área embaixo da curva como parâmetro. Por sua vez, Sakata e Karaki (1992) não observaram diferenças entre os E_{MAX} s da ET-1 no útero grávido (20 dias) ou não-grávido em

estro pelo método da área embaixo da curva, mas relataram que o útero grávido apresenta uma resposta contrátil isométrica máxima a 30 nM de ET-1 cinco vezes maior que o útero em estro (em mg de contração por mm² de tecido). Além disso, Izumi et al. (1995) descreveram um aumento progressivo das contrações isométricas induzidas por ET-1 (e maior ainda por OT) em microfragmentos de miométrio longitudinal de rata ao longo da segunda metade da gestação (14^o dia < 17^o dia < termo), quando comparadas àquelas causadas por KCl (118 mM). Em suma, as razões pelas quais há relatos discrepantes quanto a variações da E_{MAX} da ET-1 no útero de rata na condição FP ainda não são claras. Por outro lado, o E_{MAX} da ET-1 parece ser maior em útero grávido do que não-grávido em humanos (Word et al., 1992), mas não em camundongos (Gong et al., 1994 - despolarizado com 40 mM de KCl).

5.1.2. Ocitocina

Ao contrário do observado em relação à ET-1, nossos resultados indicam uma diferença segmentar pronunciada entre a reatividade das porções uterinas ovariana e cervical à OT nas condições NP e FP, mas não em MP. Embora a sensibilidade de preparações PO e PC à OT tenha sido semelhante tanto em NP quanto FP, isoladamente, houve uma clara inversão nas diferenças do E_{MAX} da OT em preparações PO e PC, da condição NP para a FP. Na condição NP o E_{MAX} da OT foi maior na preparação PO, enquanto o contrário (PC > PO) foi observado na condição FP. Essa variação segmentar na reatividade uterina à OT na condição NP parece não ter sido estudada anteriormente. Entretanto, os nossos achados na condição FP coincidem com os de Gorodeski et al. (1990), também obtidos em útero

de rata prenhe de 19 a 22 dias. Num estudo elegante, esses autores observaram que a OT causa, *in vivo*, contrações maiores no miométrio distal (cervical) do que no proximal (ovariano). A distribuição de receptores para a OT no miométrio humano também é heterogênea, mas, ao contrário do que se verifica em ratos, a densidade é maior nas porções proximais (corpo) e decresce, progressivamente, em porções mais distais em direção ao cérvix (Fuchs *et al.*, 1984). Talvez o significado fisiológico desta diferença observada entre as duas espécies esteja correlacionado ao fato que, no parto, o útero de rata precisa expelir vários fetos (começando pelos mais distais), enquanto que na condição humana, onde o útero precisa expelir apenas um feto (geralmente), seja mais conveniente que o ístmo e cérvix contraíam menos que o corpo.

Ainda em relação à OT, verificamos que a sensibilidade a este agonista, em ambas as preparações, diminuiu significativamente na condição MP (4 a 18 vezes em nível de CE_{50} , em relação aos valores em NP), para então aumentar drasticamente na condição FP para valores 5 a 28 vezes maiores que os observados em MP. A preparação PC também apresentou-se 1,6 vezes mais sensível à OT na condição FP do que na condição NP. Esses achados confirmam e complementam relatos prévios indicando que, durante a gestação, há uma redução gradativa e paralela da sensibilidade do miométrio uterino de rata à OT e da densidade de seus receptores, que são revertidos ao aproximar-se o momento do parto, quando aumenta a secreção hipofisária desse hormônio (Fuchs *et al.*, 1983; Gorodeski *et al.*, 1990; Izumi *et al.*, 1995). Processos semelhantes a esse foram também observados no miométrio humano (Garfield e Beier, 1989; Maggi *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1992; Word *et al.*, 1992; entre outros), bovino (Fuchs *et al.*,

1990), ovino (Soloff *et al.*, 1977) de cobaia (Elger e Hassam, 1985; Norström *et al.*, 1990) e de camundonga (Suzuki e Kuryiama, 1975). A exemplo do observado para a ET-1 e seus receptores, as variações de reatividade uterina à OT parecem ser controladas principalmente pela relação estrógeno/progesterona (Fuchs, 1976; Soloff, 1979; Maggi *et al.*, 1988). A densidade de receptores para OT no miométrio de rata, principalmente (mas não exclusivamente) na porção distal ou cervical, é reduzida pela progesterona e aumentada pelo estrógeno (Gorodeski *et al.*, 1990). Porém, foi recentemente demonstrado que, pelo menos no útero de rata, a presença de implantes fetais é muito mais importante do que o estrógeno ou a progesterona para o aumento da densidade de receptores para OT que ocorre ao final da gestação (Higuchi *et al.*, 1995). Há relatos de que a progesterona, no início da gestação, também inibe o acoplamento de receptores à PLC e PLA₂ mediado por proteínas G nesse tecido (Arkininstall e Jones, 1990; Morishita *et al.*, 1993).

5.1.3. Prostaglandina F_{2α}

Diferentemente do observado em relação à ET-1 e à OT, não houve qualquer alteração significativa da sensibilidade de preparações PO ou PC à PGF_{2α}, nem dentro da mesma condição, nem entre as diferentes condições. A reatividade uterina à PGF_{2α} em humanos é, diferentemente da à OT, relativamente refratária à modulação pelos hormônios sexuais (Czekanowski e Kuzniar, 1985; Calder, 1987). A ausência de variações na sensibilidade do miométrio de rata à PGF_{2α} durante a gestação, observada em nosso estudo, sugere que o mesmo se aplica nessa espécie, onde os efeitos contráteis induzidos pelo agonista envolvem a ativação de receptores FP, tanto na condição NP quanto FP (Goureau *et al.*, 1992). Essa

possibilidade é fortalecida pelo estudo de Molnár e Hertelendy (1990a), demonstrando que, até o 21º dia de gestação, não há variações significativas na densidade de sítios de ligação para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ou PGE_2) em membranas de miométrio de rata. Porém, a densidade desses sítios aumenta de modo pronunciado por ocasião do parto.

Também não observamos modificações do E_{MAX} da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na preparação PC em quaisquer das 3 condições. Entretanto, ocorreram variações significativas e pronunciadas do E_{MAX} desse prostanóide na preparação PO entre uma condição e outra, de modo que o E_{MAX} da $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi maior na preparação PO do que na PC na condição NP e, de forma ainda mais evidente, na condição MP. Porém, na condição FP os E_{MAX} s de ambas as preparações foram semelhantes. Comparando-se somente os E_{MAX} s da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na preparação PO, observou-se que o parâmetro registrado na condição MP foi maior que na NP ou FP. O aspecto mais importante desses resultados é que indicam, aparentemente pela primeira vez, que há diferenças segmentares na reatividade do útero de rata à $\text{PGF}_{2\alpha}$, principalmente na condição MP. Nesse sentido, eles alinham-se, em parte, às evidências de que o miométrio do corpo do útero humano grávido a termo responde diferentemente à $\text{PGF}_{2\alpha}$ do que o miométrio do istmo. Tanto a $\text{PGF}_{2\alpha}$ quanto a PGE_2 induzem contrações marcantes do corpo uterino, enquanto que o istmo é praticamente refratário à $\text{PGF}_{2\alpha}$ e responde à PGE_2 com relaxamento (Wikland et al., 1984; Wiqvist et al., 1985). Ratificando esse achado, Hofmann et al. (1983) observaram que a densidade de receptores no miométrio humano decresce do corpo em direção ao cérvix. Por outro lado, no miométrio humano obtido por ocasião de cesariana eletiva (i.e., ainda não a termo), a $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem um nítido efeito excitatório no istmo

mediado por receptores FP, mas não contrai o corpo, enquanto a PGE₂ estimula e, em doses maiores, relaxa ambas as porções, através de receptores EP₃ e EP₂, respectivamente (Wikland et al., 1982; Wikvist et al., 1985; Senior et al., 1993). Cumpre salientar que os achados de reatividade diferencial entre porções de miométrio humano referem-se ao final de gestação, enquanto em nosso estudo as diferenças mais pronunciadas foram detectadas na condição MP, estando ausentes na condição FP. Por outro lado, Gong et al. (1994) relataram que no útero de camundonga o E_{MAX} do carboprost, um análogo sintético da PGF_{2α}, é duas vezes maior na condição MP do que na FP (as CE₅₀s são iguais), mas não distinguiram entre as diferentes porções do útero. Finalmente, Word et al. (1992) descreveram que o miométrio humano grávido (tanto do corpo quanto de porções mais inferiores) é menos reativo à PGF_{2α} do que o não-grávido.

5.1.4. Heterogeneidade segmentar das variações na reatividade uterina aos agonistas

Os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações que ocorrem na reatividade do miométrio ao longo da gestação e, principalmente, ao final desse processo, que parece-nos ser potencialmente importantes do ponto de vista fisiológico, ainda são pouco claros. Há relatos de que a maior reatividade do miométrio do corpo uterino humano a mediadores contráteis no final da gestação, seja associada à maior sensibilidade do miométrio cervical a relaxamento por prostanóides como a PGE₂ (Wingerup *et al.*, 1978), sendo importantes para desencadear a expulsão do feto (Wolff *et al.*, 1996).

Um dos diversos mecanismos pelos quais o estado hormonal poderia modular, diferencialmente, a reatividade do útero de rata à ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ é através de alterações na densidade relativa de receptores para cada um desses agonistas, conforme mencionado acima. Outro possível mecanismo seria causado pela modificação do acoplamento mediado através das proteínas G às diversas vias de transdução de sinal. Há evidências de que a expressão de diferentes tipos de proteínas G no miométrio de cobaia é significativamente alterada ao longo da gestação, podendo contribuir de modo importante na aquiescência uterina durante maior parte da gestação e a reversão desse estado no termo (Warsop *et al.*, 1993). Os níveis da subunidade α da proteína G_s (que ativa a adenilato ciclase em resposta à ativação de adrenoceptores β_2 , por exemplo) são elevados no miométrio NP, mas são reduzidos a 25% no termo. Ao contrário, os da subunidade α de G_i e G_o (que inibem a adenilato ciclase) são baixos na condição NP, mas elevam-se 6 vezes por ocasião do parto. Por sua vez, os níveis da subunidade α da proteína $G_{q/11}$ (geralmente responsável pela ativação da PLC e geração de fosfoinosítídeos), que são elevados na condição NP, variam de forma bifásica na gestação, sendo substancialmente reduzidos na condição MP, mas sofrem um aumento abrupto de 3 vezes (em relação a NP) no termo (Arkinstall e Jones, 1990; Warsop, 1993). Outro estudo demonstrou alterações, semelhantes aos observados na cobaia, nos níveis de subunidades α das proteínas $G_{q/11}$ e G_{12} (mas não G_{13}) e seus respectivos RNAm ao longo da gestação no miométrio de ratas não-prenhes e prenhes (Cohen-Tannoudji *et al.*, 1995). Esses autores também relataram que o tratamento de rata não-prenhe com progesterona provoca, 30 h depois, redução de 30% nos níveis de subunidades α das proteínas $G_{q/11}$ (e respectivo RNAm) no miométrio. Por sua vez,

o estradiol acarretou, 18 h depois, acréscimos significantes dos níveis de subunidades α das proteínas G_{i2} (40%) e seu respectivo RNAm (32%). Assim, as proteínas G_{i2} e $G_{q/11}$ parecem ser alvos fisiológicos importantes da progesterona e do estradiol no miométrio de rata, respectivamente.

Porém, as considerações feitas no parágrafo anterior são insuficientes para explicar totalmente as variações diferenciadas e segmentares de reatividade do útero de rata nas diferentes condições, pois os receptores para ET-1 (ET_A), OT e $PGF_{2\alpha}$ (FP) estão todos acoplados, através da proteína $G_{q/11}$, à fosfolipase C nesse tecido (Bouso-Mittler et al., 1989; Ruzycky e Crankshaw, 1988). Wollberg et al. (1992) observaram que a ET-1 é mais potente em induzir contrações tônicas no útero de rata em próestro, do que em estro ou metaestro, mas que a sua capacidade máxima em gerar fosfoinosítídeos é maior no estro do que em próestro ou diestro. Assim, há mecanismos adicionais envolvidos na contração uterina estimulada pela ET-1, além da produção de fosfoinosítídeos, pelo menos em diferentes fases do ciclo estral da rata. Nesse sentido, o receptor ET_A do útero de rata imatura, tratada com estradiol, encontra-se acoplado tanto à PLC (proteína $G_{q/11}$) quanto à inibição da adenilato ciclase (proteína G_i - Khac et al., 1992).

Molnár e Hertelendy (1995) demonstraram que as vias de transdução de sinal ativadas pela ET-1, OT e $PGF_{2\alpha}$, em células de miométrio isoladas de rata próxima ao termo, apresentam diferenças marcantes. Embora os 3 agonistas causem um aumento bifásico do efluxo de cálcio radiomarcado dessas células (ordem de potências OT > $PGF_{2\alpha}$ > ET-1), inibidores da PLC ou um antagonista do IP_3 (heparina) inibem as respostas induzidas pela OT e a ET-1 de modo pronunciado, mas não a resposta à $PGF_{2\alpha}$. Os 3 agonistas também estimulam a produção de

fosfatos de inositol (IP_1 , IP_2 e IP_3), mas a ordem de potência para esse efeito é distinta e a potência da $PGF_{2\alpha}$, em particular, é especialmente baixa ($OT > ET-1 \gg PGF_{2\alpha}$). O mesmo trabalho evidenciou ainda que, ao contrário da ET-1 e da $PGF_{2\alpha}$, a síntese de fosfoinosítídeos ativada pela OT é marcadamente susceptível à inibição por pré-incubação das células com toxina de *Bordetella pertussis*, que ribosila as subunidades α das proteínas G_i e G_o . Tais achados indicam que as proteínas G que viabilizam a mobilização de cálcio, de estoques reticulares sensíveis ao IP_3 , induzida pela OT e a ET-1 são distintas. Além disso, juntamente com achados anteriores (Molnár e Hertelendy, 1990b), demonstram que a $PGF_{2\alpha}$ atua principalmente em promover o influxo de cálcio através da membrana plasmática, enquanto que as respostas à OT dependem apenas em parte desse tipo de mecanismo.

Há evidências adicionais de que a OT e a ET-1 induzem contração do útero de rata através de mecanismos distintos. Confirmando achados prévios com a ET-1 em miométrio de rata não-prenhe (Rae et al., 1993), Izumi et al. (1995) mostraram que as contrações induzidas por OT, em microfragmentos de miométrio de rata prenhe a termo, são mais resistentes à remoção de cálcio do meio extracelular que as causadas por ET-1, embora ambos os agonistas ainda contraíssem a preparação nessas condições. Além disso, verificaram que tanto a OT quanto o $GTP\gamma S$ (que impede a reassociação do trímero $\alpha\beta\gamma$ de proteínas G potencializam a contração induzida por cálcio em preparações previamente permeabilizadas ("skinned"), enquanto a ET-1 mostrou-se inefetiva. Esses resultados indicam que a OT, mas não a ET-1, também sensibiliza as miofibrilas ao cálcio no útero de rata a termo, corroborando achados anteriores de Sakata e Karaki (1992) no útero de rata prenhe de 20 dias, embora a ET-1 possa sensibilizar o útero de cobaia não-prenhe

tratada com estradiol (Sakata et al, 1989). A exemplo do útero de rata, há também diferenças consideráveis nos mecanismos subjacentes às contrações induzidas pela ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ no útero humano grávido e não-grávido (Molnár e Hertelendy, 1990b; Word et al., 1990, 1992), e pela OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ no miométrio de coelha prenhe ou não-prenhe (Okawa et al., 1993).

Os níveis de encefalinase, a principal enzima que degrada a ET-1, aumentam consideravelmente no endométrio humano não-grávido na fase lútea do ciclo menstrual, para então diminuir na fase menstrual, possivelmente em resposta aos níveis tissulares de progesterona (Casey et al., 1991; Marsh et al., 1995). Os níveis de ET-1 no tecido variam em sentido inverso. Durante a gravidez, há também atividade pronunciada da encefalinase em diversos tecidos placentários fetais (âmnio, córion *laevis* e decídua parietal), que parece ser maior em tecidos placentários obtidos por cesariana eletiva do que por parto natural (Germain et al., 1994). Também observa-se a presença de prostaglandina desidrogenase, a enzima que metaboliza as PGs, nos mesmos tecidos fetais, com excessão do âmnio. Porém, a metabolização de PGs por tecidos fetais (córion ou âmnio) durante o parto espontâneo ou por cesariana eletiva não parece ser diferentes (Brennand et al., 1995). Por outro lado, os níveis placentários de ocitocinase, a cisteil-aminopeptidase que degrada a OT no útero, são particularmente altos no córion *laevis*, mas a enzima também é encontrada no âmnio e decídua parietal (Germain et al., 1994). Além disso, está bastante claro que os níveis circulantes de ocitocinase aumentam progressivamente até cerca de 10 vezes durante a gestação, embora essa enzima não pareça ser responsável pela degradação da OT na circulação materna (Majkic'-Singh et al., 1982). Assim sendo, fatores farmacocinéticos relacionados ao

metabolismo da ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos diferentes tecidos associados ao útero, também poderiam contribuir para as mudanças diferenciadas que ocorrem no transcorrer da gestação na reatividade do miométrio aos 3 agonistas.

Finalmente, tais diferenças na reatividade uterina a agonistas miotrópicos poderiam ser decorrentes de influências inibitórias seletivas exercidas por compostos relaxantes produzidos no útero ou tecidos adjacentes durante a gestação, como a relaxina (Downing e Hollingsworth, 1993; Hughes e Hollingsworth, 1996) e o óxido nítrico (Papka e McNeill, 1992; Yallampalli *et al.*, 1993; Natuzzi *et al.*, 1993; Jaing *et al.*, 1996). De forma bastante elegante, Snyder *et al.* (1994) verificaram que a decídua exerce uma influência inibitória significativa, porém distinta, sobre as respostas do miométrio transversal do útero de rata prenhe de 18 - 20 dias induzidas por OT ou $\text{PGF}_{2\alpha}$. Contudo, os autores não caracterizaram os possíveis mediadores envolvidos nessa modulação exercida pela decídua, que poderiam incluir prostanóides, citocinas ou a própria OT.

Considerando que tanto a miométrio quanto o endométrio uterino de rata são capazes de gerar prostanóides (Campos *et al.*, 1980 ; Brown e Poyser, 1985; Franchi *et al.*, 1985; Jouanen *et al.*, 1985), julgamos procedente avaliar, ainda que indiretamente através de um inibidor de COX, qual seria a importância desses prostanóides na reatividade da musculatura lisa uterina à ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$.

5.2. Influência da indometacina nas contrações do útero isolado de rata induzidas por ET-1, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e OT em diferentes condições

A exposição de porções PO e PC de útero de rata ao inibidor de ciclo-oxigenase indometacina, *in vitro*, determinou alterações variadas da reatividade da

preparação, que dependeram tanto do agonista quanto da condição. Por exemplo, a indometacina não afetou a reatividade de preparações PO ou PC à ET-1 na condição NP, mas reduziu as contrações induzidas pelo agonista na condição FP. Também, a droga potencializou as respostas à OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ em preparações PC (mas não PO) na condição NP, bem como em preparações PO na condição FP, mas causou o contrário (i.e. inibição das contrações) em preparações PC na condição FP. Em vista dos diferentes mecanismos envolvidos nas contrações promovidas pelos 3 agonistas no útero de rata, discutidos na seção precedente, talvez essa variabilidade na resposta à indometacina não seja totalmente inesperada. Contudo, a heterogeneidade segmentar verificada em relação à reatividade de preparações PO e PC à OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi tão marcada que, na condição FP, as respostas médias obtidas agrupando-se os valores das preparações PO + PC na ausência ou presença de indometacina não diferiram significativamente entre si para qualquer desses dois agonistas ($P > 0,05$, teste "t" bicaudal de Student; resultados não apresentados). Talvez seja por isso que alguns trabalhos anteriores não tenham detectado quaisquer influências da indometacina nas respostas causadas por ambos agonistas nessa preparação.

Há evidências que as ETs estimulam a liberação de prostanóides em diversos tecidos e células, e que esse fenômeno afeta a magnitude dos efeitos produzidos por esses peptídeos (Hyslop e De Nucci, 1992). Especificamente no trato genital feminino, a ET-1 estimula a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células endometriais cultivadas humanas (Cameron et al., 1991; Ahmed et al., 1992). Como o endométrio não foi removido das preparações utilizadas no presente estudo, é possível sugerir que a ET-1, nas condições MP e FP, tenha estimulado a liberação de PGs excitatórias do

endométrio, e que estas, por difusão, tenham alcançado o miométrio. O miométrio de rata (com ou sem endométrio associado) produz PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ em todas as condições analisadas no presente estudo, embora a produção desses prostanóides seja maior na condição FP que no 15º dia de gestação (Gu et al., 1990). Diferentemente da $PGF_{2\alpha}$, que induz apenas contração do miométrio, a PGE_2 causa também relaxamento uterino, principalmente em porções cervicais a termo (ver Introdução). Alternativamente, os efeitos da indometacina em nosso estudo poderiam refletir um sinergismo entre a ET-1 e PGs presentes no miométrio. De fato, há relato de sinergismo entre os efeitos contráteis da ET-1 e a $PGF_{2\alpha}$ no útero isolado de rata na condição NP, mas não na condição FP (Calixto e Rae, 1991). No presente estudo, a indometacina não afetou a reatividade à ET-1 na condição NP, mas reduziu significativamente as contrações induzidas pelo peptídeo na condição FP e, em grau menor, na condição MP. Por outro lado, nossos resultados na condição FP confirmam o relato de Izumi et al. (1995) de que a indometacina reduz consideravelmente a reatividade do útero de rata à ET-1 nessa condição.

As evidências da literatura com relação à habilidade da indometacina em inibir contrações uterinas induzidas pela OT são contraditórias. Alguns estudos demonstraram que a indometacina inibe significativamente contrações induzidas pela OT em útero de rata ovariectomizada ou tratada com estradiol (Vane e Williams, 1973; Aizawa e Shimizu, 1978; Whalley, 1978; Hall, 1983; Caldwell e Gardner, 1986) ou de coelha não-prenhe, mas não no início da gestação (Laudanski et al., 1977). Porém, em humanos, a indometacina inibe as contrações induzidas pela OT (mas não pela $PGF_{2\alpha}$) em miométrio não-grávido, no início da gestação (Garrioch, 1978) e a termo (Quaas et al., 1987). Por outro lado, Chan (1977) e

Franchi et al. (1990) não detectaram qualquer influência da indometacina nas contrações induzidas pela OT em útero de rata tratada ou não com estradiol. Também há controvérsia quanto à capacidade da OT induzir a liberação de prostanóides no útero. Em útero humano a termo (Fuchs et al., 1981; Quaas et al., 1987) e de ovinos em estro (Roberts e McCracken, 1976) a OT libera $\text{PGF}_{2\alpha}$ do endométrio, mas não do miométrio, enquanto que no miométrio de cobaia a OT (ao contrário da ET-1) não libera ácido araquidônico (Khouja e Jones, 1992a). Alguns observaram que a OT promove a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (mas não de PGE_1 ou PGE_2) no útero de rata (Campos et al., 1980; Franchi et al., 1990), mas outros não encontraram evidências nesse sentido (Ishikawa e Fuchs, 1978). Tanto Chan (1977) quanto Franchi et al. (1990) sugeriram que, no útero de rata, há uma dissociação entre a atividade miotrópica da OT e sua capacidade de promover liberação de prostanóides. Embora nossos resultados não permitam resolver essa questão, talvez ofereçam uma explicação plausível para a controvérsia, no sentido que a influência da indometacina nas contrações induzidas pela OT em preparações PC e PO diferem marcadamente nas 3 condições. É interessante destacar que não encontramos na literatura qualquer menção à potencialização, pela indometacina, de contrações uterinas em resposta a esse agonista. No entanto, nossos resultados apontam para a ocorrência de tal fenômeno na preparação PO na condição FP, mas o contrário foi detectado na preparação PC nessa mesma condição.

A indometacina influenciou a reatividade do útero de rata à $\text{PGF}_{2\alpha}$ de modo bastante semelhante ao perfil observado em relação à OT. Essa constatação chega a ser surpreendente quando se considera os diferentes mecanismos de ação da OT e da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no miométrio de rata no último dia de gestação (Molnár e Hertelendy,

1995) e em células cultivadas de miométrio humano (Hertelendy et al., 1995). Porém, convém lembrar que ambos os agonistas provocam, ainda que por mecanismos distintos, aumento da concentração de cálcio livre no citosol, e que o cátion é importante na ativação da pelo menos uma das isoformas de PLA₂ e conseqüente mobilização do ácido araquidônico (Bonney et al., 1992). Não encontramos na literatura relatos específicos sobre a influência da PGF_{2α} na produção de prostanóides pelo útero de rata. Contudo, tal ação é provável, já que o receptor FP para a PGF_{2α} controla influxo de cálcio no miométrio dessa espécie. Por outro lado, embora Garrioch (1978) tenham observado que a indometacina não afeta contrações do miométrio humano não-grávido ou em início de gestação induzidas pela PGF_{2α}, embora iniba as contrações estimuladas pela OT, Hertelendy et al. (1995) demonstraram que, a exemplo da OT mas por mecanismos distintos, a PGF_{2α} causa mobilização de ácido araquidônico em células cultivadas do miométrio humano.

Uma comparação dos efeitos distintos da indometacina sobre as contrações induzidas, por um lado, pela ET-1 e, de outro, pela OT e PGF_{2α}, bem como a variação desses efeitos entre as 3 condições, aponta dois aspectos interessantes. Primeiro, o acoplamento dos receptores ET_A à ativação da PLA₂, bem como a sua modulação por hormônios, parecem ser diferentes das observadas em relação ao receptor FP ou OT. Segundo, as vias metabólicas subseqüentes à conversão do ácido araquidônico em endoperóxidos pela COX em resposta à ativação desses receptores também são distintas, principalmente na preparação PO na condição FP. Nesse sentido, seria interessante analisar, no futuro, quais são os prostanóides inibitórios efetivamente liberados pela OT e PGF_{2α} (mas não pela ET-1) na

preparação PO de rata na condição FP. Prostanóides endógenos que poderiam induzir relaxamento do miométrio incluem a PGE₂ e a PGI₂ (Wikland *et al.*, 1983; Wiqvist *et al.*, 1985). No miométrio humano obtido durante cesariana eletiva, doses elevadas de PGE₂ causam relaxamento do corpo, mas não do ístmo (Wikland *et al.*, 1982), enquanto no miométrio a termo este prostanóide contrai o corpo e relaxa o ístmo (Wikland *et al.*, 1984).

As PGs parecem exercer papéis importantes no controle do tono uterino em diversas espécies, particularmente na fase final da gestação. Há evidências de que, no final da gestação e por ocasião do parto, a produção de PGs pelo útero e/ou miométrio está aumentada em ratos (Wilson *et al.*, 1982; Wilson e Lindsey, 1987), coelhos (Bloch *et al.*, 1983) e humanos (Sellers *et al.*, 1982; Fuchs e Fuchs, 1984 - ver também variações durante ciclo menstrual em Bonney, 1985). Nesse sentido, também foi relatado aumento pronunciado da atividade da PLA₂ no útero a termo humano (Bennet *et al.*, 1993) e de cobaia (Khouja e Jones, 1992b), onde há aumentos de atividade na região do cérvix na ordem de 10 a 50 vezes na condição FP e de 75 vezes no termo (Rajabi e Cybulsky, 1995). Além disso, há aumento da expressão da tromboxano A₂-sintetase no útero humano a termo (Swanson *et al.*, 1992).

Uma etapa crucial na formação de PGs a partir do ácido araquidônico é a transformação desta em endoperóxidos (PGG₂ e PGH₂) pela COX. Recentemente, foi demonstrada a existência de pelo menos duas isoformas dessa enzima: a ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Enquanto a COX-1 é uma enzima constitutiva, presente em praticamente todas as células, a COX-2 tem a sua expressão aumentada, de forma pronunciada, por citocinas e mitógenos e inibida

por glicocorticóides (para revisão ver Pairet e Engelhardt, 1996). Diferentemente da COX-1, a presença da COX-2 é restrita, normalmente, a apenas alguns tecidos ou células, e sua expressão aumenta marcadamente em tecidos inflamados. O útero é um dos poucos órgãos onde a expressão de COX-2 parece ocorrer como evento fisiologicamente normal, especialmente nas fases finais da gestação (Bennet e Slatter, 1995). Entre os diversos tecidos intra-uterinos, os que mais expressam a COX-2 e PLA₂ (do tipo c ou s) são o âmnio e, em menor grau, a placenta, enquanto que a COX-1 é encontrada difusamente e em níveis baixos no âmnio, córion e decidua. A relação COX-2/COX-1 em membranas fetais e placenta humanos, que normalmente é baixa ao longo do primeiro, segundo e início do terceiro trimestres de gestação, aumenta de forma muito pronunciada (> 100 vezes) ao final do terceiro trimestre e, mais ainda, por ocasião do parto (Bennet e Slatter, 1995). É importante salientar, ainda, que os inibidores de COX diferem consideravelmente quanto às suas eficácias em inibir a COX-1 e a COX-2. Alguns, como flurbiprofeno, naproxeno e salicilato não apresentam seletividade inibitória, bloqueando quase que igualmente ambas as isoformas (Mitchell et al., 1993; Pairet e Engelhardt, 1996; Vane e Botting, 1996). Outros apresentam maior potência em inibir a COX-1 do que a COX-2, como ibuprofeno, indometacina e piroxicam, que exibem uma relação de CE_{50s} para inibição de COX-2 e COX-1 em macrófagos cultivados de cobaia de 15, 60 e 250 vezes, respectivamente (Mitchell et al., 1993).

Diante dessas considerações, e em vista da alteração pronunciada no aparente acoplamento de receptores ET_A no útero de rata ao longo da gestação (revelada no presente estudo pelo uso da indometacina), a última série de experimentos procurou avaliar se a síntese de prostanóides estimulada pela ET-1 na

condição FP estaria associada ao aumento da expressão de COX-2 nessa preparação. Como não houve diferenças na reatividade de preparações PO e PC à ET-1, bem como na influência da indometacina nas contrações induzidas por esse agonista, não fizemos distinção entre as diferentes porções nesses experimentos. Foi observado que, a exemplo da indometacina, o piroxicam (*in vitro*, 5 μ M) reduziu de modo marcante as contrações induzidas por ET-1 na condição FP. Contrastando com esses resultados, o ibuprofeno (5 ou 10 μ M) praticamente não alterou a reatividade uterina à ET-1. Uma análise da capacidade do ibuprofeno, indometacina e piroxicam em inibir a COX-2 de macrófagos ativados com endotoxina bacteriana revelou CE_{50} s inibitórias de 73; 1,7 e 0,6 μ M, respectivamente (Mitchell et al., 1993). Uma comparação desses valores com as concentrações de ibuprofeno, indometacina e piroxicam empregadas no presente estudo (5 a 10 μ M), sugere que a concentração de ibuprofeno (mas não dos outros dois agentes) tenha sido insuficiente para inibir a COX-2. Como o ibuprofeno, ao contrário da indometacina ou do piroxicam, praticamente não alterou as contrações induzidas pela ET-1, parece que há um acoplamento importante de receptores ET_A à formação de PGs excitatórias pela via controlada por COX-2 no útero de rata na condição FP.

Nossos resultados contrastam frontalmente com o relato de Myatt et al. (1994) de que o miométrio de rata prenhe de 16 a 22 dias não expressa a COX-2 detectável por anticorpo policlonal específico, embora a expressão de COX-1 nesse tecido aumente progressivamente no decorrer da fase final da gestação. Mais recentemente, Dong *et al.* (1996) usando anticorpos monoclonais confirmaram que a musculatura longitudinal do útero de rata é desprovida de COX-2, mas tanto essa isoforma quanto a COX-1 (em menor grau) é encontrada na camada circular de

musculo liso, bem como no endométrio de rata virgem ou prenhe. Esses autores mostraram, ainda, que os níveis uterinos de COX-2 (mas não de COX-1) variam no transcorrer do ciclo estral, e que os níveis de ambas as isoformas aumentam de modo pronunciado no fim da gestação. Diante desses achados, é possível que a eficácia inibitória da indometacina e do piroxicam sobre as contrações induzidas pela ET-1 do miométrio longitudinal do útero em FP reflita a capacidade do peptídeo em estimular a atividade da COX-2 no endométrio ou no miométrio circular, e que as PGs geradas por essas células difundam até o miométrio longitudinal. Claramente, novos estudos são necessários para testar essa hipótese. Por outro lado, o miométrio humano grávido também expressa tanto COX-1 quanto COX-2, mas há controvérsias quanto à relação COX-1/COX-2 no decorrer da fase final de gestação. Zuo et al. (1994) observam um aumento progressivo da relação (COX-2 > COX-1) até imediatamente antes do parto, enquanto Moore et al. (In press, apud Bennet e Slatter, 1995) descrevem que a expressão de ambas as isoformas é semelhante no miométrio a termo.

Uma das características básicas que distingue a COX-2 da COX-1 é que a expressão da primeira pode ser inibida por glicocorticóides (Masferrer e Seibert, 1994; Pairet e Engelhardt, 1996). Nesse sentido, evidenciamos que o tratamento com o glicocorticóide dexametasona *in vivo* por 2 dias (dias 19 e 20 de gestação), mas não *in vitro* (1 μ M), reduziu as respostas do útero de rata em FP à ET-1 a níveis semelhantes aos observados normalmente na presença de indometacina. A dexametasona *in vivo* também aboliu a capacidade da indometacina (*in vitro*) em inibir as contrações induzidas por esse agonista, desmascarando uma potencialização das respostas à ET-1 pelo inibidor de COX. O tratamento *in vivo* por

2 dias com indometacina (dias 19 e 20 de gestação) determinou alterações na reatividade à ET-1 muito parecidas com as verificadas em preparações de animais tratados com dexametasona.

Esses últimos dois grupos de resultados poderiam também ser interpretados no sentido de um aumento da expressão de COX-2 no útero de rata na condição FP. Porém, é importante destacar que os glicocorticóides podem atuar em outras etapas da síntese de prostanóides, por exemplo suprimindo a expressão da PLA₂ e estimulando a produção de lipocortina-1, proteína que não só dificulta a ativação dessa enzima (Boumpas *et al.*, 1991; Masferrer e Seibert, 1994; Coméra e Russo-Marie, 1995), como pode ligar-se ao RNAm da COX, impedindo sua transcrição (Bailey e Verma, 1991). Nossos resultados são ainda insuficientes para afirmar se, nas condições desse estudo, a dexametasona atuou sobre a expressão de COX-2 e/ou PLA₂. Apesar disso, parece procedente mencionar que o tratamento *in vivo* por 2-3 dias tanto com indometacina (Fuchs *et al.*, 1976; Weinstein *et al.*, 1977) como com dexametasona (Chatterjee *et al.*, 1993) retarda o parto em ratos. Além disso, tem sido proposto que o tratamento com glicocorticóides pode prevenir o parto prematuro em nossa espécie (Thorburn *et al.*, 1977), e que o emprego de inibidores de ciclo-oxigenase retarda o início e aumenta a duração do parto (Lewis e Schulman, 1973).

5.3. Considerações Finais

O presente estudo avaliou a reatividade de diferentes porções do útero de rata aos 3 agonistas que parecem ser os mediadores miotrópicos fisiológicos mais importantes na deflagração do trabalho de parto. Observamos não apenas

diferenças segmentares importantes e seletivas para cada um desses agonistas, incluindo a possível mediação dos seus efeitos contráteis por prostanóides, como também alterações distintas na reatividade desse tecido a cada um deles durante a gestação, principalmente na condição FP. Há relatos de sinergismo significativo entre a ET-1 e a OT no miométrio humano não-grávido (Maggi et al., 1993) ou grávido (Valenzuela et al., 1995) e no miométrio de coelha prenhe (Peri et al., 1992), entre a ET-1 e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no útero de rata não-prenhe (Calixto e Rae, 1991), e entre a OT e PGs ($\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2) em útero de rata prenhe (Husslein et al., 1982). Além disso, as PGs estimulam a expressão de receptores ocitocinérgicos no miométrio de ratas prenhes (Chan, 1987) e facilita alostericamente a ligação da OT a seus receptores em miométrio grávido humano (Fukai et al., 1984). É interessante ressaltar que, no miométrio de ovelha e coelha não-prenhes, além das PGs aumentarem a resposta à OT, podem estimular a formação de junções comunicantes, permitindo assim um maior sincronismo entre as respostas contráteis das células musculares do miométrio (Liggins et al., 1977; Laudanski et al., 1977). O presente estudo não avaliou o grau de sinergismo que possa haver entre a ET-1, OT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ em diferentes porções do útero de rata nas diversas condições. Certamente, na luz dos resultados aqui apresentados, um estudo dessa natureza contribuiria de modo significativo para delinear a importância relativa de cada uma dessas substâncias no controle da motilidade do miométrio não-grávido ou grávido nessa espécie.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo analisou as respostas contráteis das porções ovariana (ou proximal; PO) e cervical (ou distal: PC) de útero isolado de rata não-prenhe (NP) e prenhe de 12 dias (MP) e de 21 dias (FP) à ET-1 (0,1 - 100 nM), OT (0,1 - 300 nM) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 - 1000 nM), bem como avaliou a influência dos prostanóides endógenos nas contrações induzidas pelos 3 agonistas, através do emprego de inibidores de ciclo-oxigenase (COX) e da dexametasona. Os resultados obtidos revelaram que:

1. Os três agonistas causaram aumento da frequência das contrações espontâneas, bem como contrações tônicas, em ambas as preparações em todas as três condições.
2. Não houve diferenças entre a reatividade de preparações PO e PC à ET-1 em cada uma das condições, mas o E_{MAX} e a CE_{50} obtidas em ambas preparações foram menores na condição FP do que na NP (23% e 2,5 vezes, respectivamente).
3. O E_{MAX} da OT foi maior na preparação PO do que na PC na condição NP (22%), igual na MP e menor na condição FP (28%). Embora as CE_{50} s à OT em preparações PO e PC tenham sido iguais dentro de cada uma das condições NP e FP, na condição MP a preparação PO foi 4 vezes mais sensível a esse agonista do que a PC. Ainda com relação à OT, as CE_{50} s observadas na condição MP foram de 4 a 18 vezes maiores do que na condição NP, enquanto que na condição FP houve reduções desse parâmetro de 5 a 28 vezes em relação aos valores obtidos na condição MP.
4. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ induziu um E_{MAX} maior na preparação PO que PC na condição NP (38%) e, de forma mais acentuada, na condição MP (79%). Na condição FP esse

parâmetro foi semelhante em ambas as preparações. Não foram observadas quaisquer diferenças com relação à CE_{50} desse agonista nos vários grupos.

5. A potência da OT foi maior que a da ET-1 nas duas porções, tanto na condição NP quanto na FP, mas os agonistas foram equipotentes em nível da CE_{50} em ambas as preparações na condição MP. A $PGF_{2\alpha}$ foi menos potente que a ET-1 ou a OT em todos os grupos. O E_{MAX} da ET-1 foi igual ao da OT em todos os grupos, exceto na preparação PC na condição NP, onde ocorreu o inverso. Na preparação PO na condição MP o E_{MAX} da ET-1 foi igual ao da $PGF_{2\alpha}$, mas nos demais grupos o E_{MAX} do prostanóide foi menor que o da ET-1. O E_{MAX} da $PGF_{2\alpha}$ foi menor que o da OT em três grupos (PO-NP, PC-MP e PC-FP) e igual nos demais (PO-NP, PO-FP e PC-NP).

6. A incubação com indometacina (5,6 μ M), um inibidor de ciclo-oxigenases, reduziu o E_{MAX} da ET-1 na preparação PC nas condições MP e FP (12 e 16%), bem como a potência do agonista na preparação PO em MP (2 vezes) e na PC em FP (3 vezes). A droga também aumentou o E_{MAX} da OT e da $PGF_{2\alpha}$ na preparação PC em NP (16 e 40 %), bem como na preparação PO em FP (63 e 80%), mas reduziu esse parâmetro da OT na preparação PO em MP e PC em FP (19 e 43%). A indometacina reduziu a potência da OT nos grupos PO-NP, PO-MP e PC-FP (1,8; 2,8 e 6 vezes, respectivamente) e a da $PGF_{2\alpha}$ no grupo PO-MP e PC-FP (4,4 e 3,5 vezes), mas aumentou a potência desse agonista no grupo PC-NP (8,6 vezes).

7. Combinando-se os grupos PO e PC na condição FP, a incubação com indometacina aumentou a CE_{50} à ET-1 em 2 vezes e reduziu o E_{MAX} do agonista em 34%. Efeitos semelhantes foram observados após incubação das preparações com o piroxicam (5 μ M), i.e. aumento de 2 vezes e redução de 26%, respectivamente.

Em contraste, a reatividade à ET-1 não foi modificada pela incubação com o ibuprofeno (10 μ M) ou com o glicocorticóide dexametasona (1 μ M). O tratamento de animais com dexametasona (0,35 mg/kg/dia, i.p.) ou com indometacina (3 mg/kg/dia, i.p.) por dois dias, a partir do 19^o dia de gestação, bloqueou as modificações induzidas pela incubação com indometacina *in vitro* na reatividade à ET-1. Em preparações de ratas tratadas com dexametasona, a incubação com indometacina aumentou o E_{MAX} da ET-1 em 23%.

Os resultados desse estudo indicam a ocorrência de diferenças segmentares importantes e seletivas na reatividade do útero isolado de rata à ET-1, OT e PGF_{2 α} , bem como na possível mediação e/ou modulação dos seus efeitos contráteis desses agonistas por prostanóides. Também evidenciam alterações distintas na reatividade desse tecido a cada um dos agonistas analisados durante a gestação, principalmente na condição FP. Sugerimos ainda evidências funcionais indiretas de que as respostas do útero de rata à ET-1, na condição FP (diferentemente da condição NP), envolvem um acoplamento significativo com a geração de prostanóides excitatórios pela COX-2, que é bloqueado pelo tratamento *in vivo* com dexametasona, possivelmente por redução na expressão da COX-2 ou da fosfolipase A₂.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study evaluates the responsiveness of different portions of the uterus (more proximal to the ovary or PO; and more proximal to the cervix or PC) from either non-pregnant rats (NP) in estrous, or mid-pregnant (12 days; MP) or late-pregnant (21 days; LP) rats, to contractions induced *in vitro* by endothelin-1 (ET-1; 0.1 - 100 nM), oxytocin (OT; 0.1 - 300 nM) or prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}; 1 - 1000 nM). The possible roles of prostanoids in these responses were also evaluated, by use of cyclo-oxygenase (COX) inhibitors and dexamethasone. The results revealed that:

1. All three agonists increased the rate of phasic spontaneous contractions and induced tonic contractions. Only the latter were quantitatively measured.
2. The responsiveness (E_{MAX} and EC_{50}) of both PC and PO uterine strips to ET-1 were similar in each of the conditions, but these parameters were reduced in both portions during LP, in comparison to values seen during NP (23% and 2.5-fold, respectively).
3. The E_{MAX} of OT was greater in PO than PC during NP (22%), similar during MP and actually smaller during LP (28%). Although the EC_{50} s to OT detected in PO and PC were similar within each condition, MP was associated with a decreased sensitivity in both portions (4 to 18-fold relative to NP), which reversed to substantially lower values during LP (5 to 28-fold, relative to MP).
4. PGF_{2α} induced a greater E_{MAX} in PO than PC during NP (38%) and even more so during MP (79%), but no such difference was observed during LP. No differences were observed regarding the EC_{50} of this agonist in the various groups.

5. The potency (EC_{50}) of OT was greater than that of ET-1 in both portions during NP or LP, but both agonists were equipotent in preparations tested during MP. $PGF_{2\alpha}$ was less potent than ET-1 or OT in all groups. The E_{MAX} of ET-1 was similar to that of OT in the all groups, except in the PC portion during NP. In the PO portion during the MP condition, the E_{MAX} of ET-1 was similar to that of $PGF_{2\alpha}$, but in all the other groups the E_{MAX} of the prostanoid was smaller than that of ET-1. The E_{MAX} of $PGF_{2\alpha}$ was lesser than OT in three experimental groups (PO-NP, PC-MP and PC-LP) and similar in the other three (PO-NP, PO-LP and and PC-NP).

6. Incubation with indomethacin (5.6 μ M), an inhibitor of both COX-1 and COX-2, reduced the E_{max} of ET-1 in PC, under MP and LP conditions (12 e 16%), as well as the potency of the PO preparation during MP (2-fold), and in PC during FC (3-fold). This drug increased the E_{max} of OT and $PGF_{2\alpha}$ in PC preparations in NP (16 and 40%), as well as in PO during LP (63 and 80%). The COX inhibitor also reduced the potency of OT in the following groups: PO-NP, PO-MP and PC-LP (1.8; 3 and 6-fold), and of $PGF_{2\alpha}$ in PO-MP and PC-LP groups (4.4 and 3.5-fold), but increased the potency of this agonist in the PC-NP group (8.6-fold).

7. When the results obtained in PO and PC preparations during LP were combined, incubation with indomethacin increased the EC_{50} to ET-1 2-fold and reduced the E_{max} of agonist by 34%. Similar effects were observed after incubation of these preparations with piroxicam (5 μ M), another COX inhibitor. In constrast, the responsiveness to ET-1 was not modified by incubation with ibuprofen (10 μ M), a COX inhibitor which is less potent against COX-2 than the other two compounds tested, or with the glucocorticoid dexamethasone (1 μ M). Treatment of the animals with dexamethasone (0.35 mg/kg/day, ip) or indomethacin (3 mg/kg/day, ip) for two

days, beginning on day 19 of pregnancy, blocked the changes in responsiveness to ET-1 induced by incubation with indomethacin *in vitro*. In preparations of rats treated with dexamethasone, incubation with indomethacin increased the E_{max} of ET-1 by 23%.

The results of this study demonstrate important and selective segmentar differences in the responsiveness of rat isolated uterus to ET-1, OT and $PGF_{2\alpha}$, as well as in the possible mediation and/or modulation of their contractile effects by prostanoids. They also constitute evidence for distinct modifications in the reactivity of this tissue to each of these agonists during pregnancy, particularly during LP. Further, we provide functional evidence that the responses of rat uterus to ET-1 during LP possibly involves a significant coupling of ET_A receptors to the generation of excitatory prostanoids by COX-2, which can be blocked by *in vivo* treatment with dexamethasone.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.; CAMERON, I.T.; FERRIANI, R.A. e SMITH, S.K. Activation of phospholipase A₂ and phospholipase C by endothelin-1 in human endometrium. *J. Endocrinol.*, **135**: 383-390, 1992.
- AIZAWA, Y. e SHIMIZU, T. Effects of estradiol and oxytocin on the release of prostaglandin-like substance from isolated rat uterus. *Jpn. J. Pharmacol.*, **28**: 847-852, 1978.
- ALEXANDROVA, M. e SOLOFF, M. S. Oxytocin receptors and parturition in the guinea pig. *Biol. Reprod.*, **22**: 1106-1111, 1980.
- ALLEN, J.; FORMAN, A.; JESPERSEN, L. T. e ANDERSSON, K. E. Effects of endogenous vasoconstrictors on maternal intramyometrial and fetal stem villous arteries in preeclampsia. *J. Hypertens.*, **7**: 529-536, 1989.
- ARKINSTALL, S. J. e JONES, C. T. Pregnancy suppresses G protein coupling to phosphoinositide hydrolysis in guinea pig myometrium. *Am. J. Physiol.*, **259**: E57-E65, 1990.
- BAILEY, J. M. e VERMA, M. Analytical procedures for a cryptic mRNA which mediates translational control of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Ann. Biochem.*, **196**: 11-18, 1991.
- BAX, W. A. e SAXENA, P. R. The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 379-386, 1994.
- BENNEGÅRD, B.; HAHLIN, M. e HAMBERGER, L. Luteotropic effects of prostaglandins I₂ and D₂ on isolated corpora luteum. *Fertil. Steril.*, **54**: 459-464, 1990.

- BENNETT, P. R.; SLATER, D. e MOORE, G. E. Expression of common cellular phospholipase A₂ by human intrauterine tissues. *Prostaglandins*, **45**: 121-127, 1993.
- BENNETT, P. e SLATER, D. COX-2 expression in labour. In: Improved non-steroid anti-inflammatory drugs. COX-2 enzyme inhibitors, pp. 167-188, Vane, J., Botting, J. e Botting, R. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1995.
- BLOCH, M. H.; McLAUGHLIN, L. L.; MARTIN, S. A. e NEEDLEMAN, P. Prostaglandin production by the pregnant and non-pregnant rabbit uterus. *Prostaglandins*, **26**: 33-46, 1983.
- BLOCH, D. K.; HONG, C. C.; EDY, R. L.; SHOWS, T. W. e QUERTERMOUS, T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene-vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. *Genomics*, **10**:236-242, 1991.
- BONNEY, R. C. Measurement of phospholipase A₂ activity in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Endocrinol.*, **107**: 183-188, 1985.
- BONNEY, R. C.; WATSON, H.; BEESLEY, J. S.; HIGHAM, J. M.; ROGERS, V. e FRANKS, S. Endometrial phospholipase A₂, polycystic ovaries and pelvic pain. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **99**: 486-491, 1992.
- BOUMPAS, D. T.; PALIOGIANNI, F.; ANASTASSIOU, E. D. e BALOW, J. E. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **9**: 413-423, 1991.
- BOUSSO-MITTLER, D.; KLOOG, Y.; WOLLBERG, Z.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E. e SOKOLOVSKY, M. Functional endothelin/sarafotoxin receptors in the rat uterus. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **162**: 952-957, 1989.

- BORGEAT, P. e SAMUELSSON, B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 3213-3217, 1979.
- BRENNAND, J. E.; LEASK, R.; KELLY, R. W.; GREER, I. A. e CALDER, A. A. Changes in prostaglandin synthesis and metabolism associated with labour and the influence of dexamethasone, RU 486 and progesterone. *Eur. J. Endocrinol.*, **133**: 527-533, 1995.
- BRINNER, V. A.; TSAI, P.; CHOONG, H. L. e SCHRIER, R. W. Comparative effects of arginine vasopressin and oxytocin in cell culture systems. *Am. J. Physiol.*, **263**: 222-227, 1992.
- BROWN, C. G. e POYSER, N. L. Further studies on prostaglandin and thromboxane production by the rat uterus during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.*, **73**: 391-399, 1985.
- BRYMAN, I.; NORSTRÖM, A. e LINDBLÖM, B. Influence of prostaglandins and adrenoceptor agonists on contractile activity in the human cervix at term. *Obstet. Gynecol.*, **67**: 574-578, 1986.
- CALDER, A. The clinical use of prostaglandins for early and late abortion. In: *Eicosanoids and reproduction*, Hillier, K. (ed.) MTP, Lancaster, pp. 184-194, 1987.
- CALIXTO, J.B. e RAE, G.A. Effects of endothelins, bay K8644 and other oxytocins in non-pregnant and late pregnant rat isolated uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, **192**: 109-116, 1991.
- CALOGERO, A. E.; RAITI, F.; NICOLOSI, G.; BURRELLO, N.; D'AGATA, R. e MANTERO, F. Effects of endothelin-1 and endothelin-3 on rat hypothalamic corticotrophin-releasing hormone and pituitary ACTH release in vitro. *J. Endocrinol.*, **140**: 419-424, 1994.

- CAMERON, I. T.; DAVENPORT, A. P.; BROWN, M. J. e SMITH, S. K. Endothelin-1 stimulates prostaglandin $F_{2\alpha}$ release from human endometrium. *Prostaglandin Leuk. Essen. Fatty Acids*, **42**: 155-157, 1991.
- CAMPOS, G. A.; LIGGINS, G. C. e SEAMARK, R. F. Differential production on $PGF_{2\alpha}$ and 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ by the rat endometrium and myometrium in response to oxytocin, catecholamines and calcium ionophore. *Prostaglandins*, **20**: 297-310, 1980.
- CARDWELL, N. e GARDNER, R. The selective effects of indomethacin on contractile responses of the isolated rat uterus. *Endocrinol. Res.*, **12**: 255-267, 1986.
- CARDWELL, J. D.; GREER, E. R.; JOHNSON, M. F.; PRANGE, A. J. Jr. e PEDERSEN, C. A. Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic sites in late pregnant and postpartum rats. *Neuroendocrinology*, **46**: 39-47, 1987.
- CASEY, M. L.; COX, S. M.; BEUTLER, B.; MILEWICH, L. e MacDONALD, P.C. Cachectin/tumor necrosis factor- α formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J. Clin. Invest.*, **83**: 430-436, 1989.
- CASEY, M. L.; SMITH, J. W.; NAGAI, K.; HERSH, L. B. e MacDONALD, P. C. Progesterone-regulated cyclic modulation of membrane metalloendopeptidase (enkephalinase) in human myometrium. *J. Biol. Chem.*, **266**:23041-23047, 1991.
- CHAN, W. Y. Relationship between uterotonic action of oxytocin and prostaglandins: oxytocin action and release of prostaglandin in isolated non pregnant and pregnant rat uteri. *Biol. Reprod.*, **17**: 541-548, 1977.
- CHAN, W.Y. Enhanced prostaglandin synthesis in the parturient rat uterus and its effects on myometrial oxytocin receptor concentrations. *Prostaglandins*, **34**: 889-902, 1987.

- CHAN, W. Y. e CHEN, D. L. Myometrial oxytocin receptors and prostaglandin in the parturition in the rat. *Biol. Reprod.*, **46**: 58-64, 1992.
- CHAN, W. Y.; CHEN, D. L. e MANNING, M. Oxytocin receptor subtypes in the pregnant rat myometrium and decidua: pharmacological differentiations. *Endocrinology*, **132**: 1381-1386, 1993.
- CHATTERJEE, A.; SINGH, R. e CHATTERJEE, R. Dexamethasone modulation of gestation length and parturition in rats. *Pharmacol. Res.*, **27**: 359-364, 1993.
- CHWALISZ, K.; FAHRENHOLZ, F.; HACKENBERG, M.; GARFIELD, R. e ELGER, W. The progesterone antagonist onapristone increases the effectiveness of oxytocin to produce delivery without changing the myometrial oxytocin receptor concentration. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**: 1760-1770, 1991.
- CLARK, S. L.; COTTON, D. B.; LEE, W.; BISHOP, C.; HILL, T.; SOUTHWICK, J.; PIVARNIK, J.; SPILLMAN, T.; De VORE, G. R.; PHELAN, J.; HANKINS, G. D. V.; BENEDETTI, T. J. e TOLLEY, D. Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **161**: 1439-1442, 1989.
- COHEN-TANNOUDI, J.; MHAOUTY, S.; ELWARDY-MEREZAK, J.; LECRIVAIN, J. L.; ROBIN, M. T.; LEGRAND, C. e MALTIER, J. P. Regulation of myometrial G_i2 , G_i3 and G_q expression during pregnancy. Effects of progesterone and estradiol. *Biol. Reprod.*, **53**: 55-64, 1995.
- COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L. e NARUMIYA, S. VIII. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.*, **46**: 205-229, 1994.
- COMÉRA, C. e RUSSO-MARIE, F. Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1043-1047, 1995.

- COOK, R. G. e HOMEIDA, A. M. Delayed luteolysis and suppression of the pulsatile release of oxytocin after indomethacin treatment in the goat. *Res. Vet. Sci.*, **36**: 48-51, 1984.
- CRANSKSHAW, D. J. e GASPAR, V. Pharmacological characterization in vitro of prostanoid receptors in the myometrium of nonpregnant ewes. *J. Reprod. Fertil.*, **103**: 55-61, 1995.
- CSAPO, A. I. Force of labor. In: Principle and practice of obstetrics and perinatology, pp. 761-780, Iffy, L. e Kaminetzky, H. A. (eds.) John Wiley & Sons, New York, 1981.
- CZEKANOWSKI, R. e KUZNIAR, B. Analysis of the correlation between the dose-response curve for prostaglandin $F_{2\alpha}$ and the progress of pregnancy, cervix ripening, pharmacologic estrogen premedication and partusisten administration in prostaglandin-induced labor. *Zentralbl. Gynakol.*, **107**: 79-83, 1985.
- DAWOOD, M. Y.; RAGHAVAN, K. S.; POCIASK, C. e FUCHS, F. Oxytocin in human pregnancy and parturition. *Obstet. Gynecol.*, **51**: 138-143, 1978.
- DAWOOD, M. Y.; YLIKORKALA, O.; TRIVEDI, D. e FUCHS, F. Oxytocin in maternal circulation and amniotic fluid during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **49**: 429-434, 1979.
- DENAULT, T.-B.; CLAING, A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SAWAMURA, T.; KIDO, T.; MASAKI, T. e LEDUC, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.*, **362**: 276-280, 1995.
- de NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALTER, C.; WARDER, T. D. e VANE, J. R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 9797-9800, 1988.

- DeWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Bioch. Biophys. Acta*, **1083**: 121-134, 1991.
- DIERICKS, K. e VANDERSANDE, F. Immunohistochemical demonstration of separate vasopressin-neurophysin and oxytocin-neurophysin neurons in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **196**: 203-209, 1979.
- DJOKIC, T. D.; NADEL, J. A.; DUSSEY, D. J.; SEKIZAWA, K.; GRAF, P. D. e BORSON, D. B. Inhibitors of neutral endopeptidase potentiate electrically and capsaicin-induced noncholinergic contraction in guinea pig bronchi. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**: 7-11, 1989.
- DONG, Y-L.; GANGULA, P. R. R.; FANG, L. e YALLAMPALLI, C. Differential expression of cyclooxygenase-1 and -2 protein in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells. *Prostaglandins*, **52**: 13-34, 1996.
- DOWNING, S. J. e HOLLINGSWORTH, M. Action of relaxin on uterine contractions - a review. *J. Reprod. Fert.*, **99**: 275-282, 1993.
- DUSSEY, D. J.; NADEL, J. A.; SEKIZAWA, K.; GRAF, P. D. e BORSON, D. B. Neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme inhibitors potentiate kinin-induced of ferret trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**: 531-536, 1988.
- ECONOMOS, K.; MacDONALD, P. C. e CASEY, M. L. Endothelin-1 gene expression and protein biosynthesis in human endometrium: potential modulator of endometrial blood flow. *J. Endocrinol. Metabol.*, **74**: 14-19, 1992.
- ELGER, W. e HASAN, S.G. Studies on the mechanism of action of antifertile prostaglandin in animal models. *Acta. Physiol. Hung.*, **65**: 415-432, 1985.

- EMOTO, N. e YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.*, **270**: 15262-15268, 1995.
- EVANS, J. J. The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ administration on progesterone after hysterectomy of guinea-pigs. *Prostaglandins*, **33**: 561-566, 1987.
- FIELDS, P. A.; LEE, A. B.; HAAB, L. M.; HWANG, J. J. e SHERWOOD, O. D. Evidence for dual source of relaxin in the pregnant rat: immunolocalization in the corpora lutea and endometrium. *Endocrinology*, **130**: 2985-2990, 1992.
- FILEP, J. G.; BATTISTINI, B. e SIROIS, P. Induction by endothelin-1 of epithelium-dependent relaxation of guinea-pig trachea in vitro: role for nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 637-644, 1993.
- FLEMING, W. W.; WESTFALL, D. P.; DE LA LANDE, I. S. e JELLETT, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **181**: 339-345, 1972.
- FRANCHI, A. M.; FALETTI, A.; GIMENO, M. F. e GIMENO, A. L. Influence of sex hormones on prostaglandins dehydrogenase activity in the rat uterus. *Prostaglandins*, **29**: 953-960, 1985.
- FRANCHI, A. M.; CHAUD, M.; FALETTI, A.; BASSI, D.; GIMENO, M. A. F. e GIMENO, A. L. Oxytocin enhances the basal release of uterine prostaglandin $F_{2\alpha}$, but not that of PGE_1 , or of PGE_2 , and changes the metabolism of exogenous arachidonate, favouring the formation of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and 5-HETE. Relationships with its uterotonic action and modulation by estradiol. *Prostaglandins Leuk. Essent. Fatty Acids*, **40**: 209-209, 1990.

- FRIED, G.; LIU, Y.A. e ANDERSSON, E. Endothelin contracts human uterine myometrium by a partly dihydropyridine-sensitive mechanism. *Act. Physiol. Scand.* **147**: 131-136, 1993.
- FROSSARD, N.; RHODEN, K. J. e BARNES, P. J. Influence of epithelium on guinea pig airway responses to tachykinins: role of endopeptidase and cyclooxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**: 292-298, 1989.
- FUCHS, F. Prevention of prematurity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **126**: 809-820, 1976.
- FUCHS, A. R.; SMITASIRI, Y. e CHANTHARAKSRI, U. The effect of indomethacin on uterine contractility and luteal regression in pregnant rats at term. *J. Reprod. Fertil.*, **48**: 331-340, 1976.
- FUCHS, A. R.; HUSSLEIN, P. e FUCHS, F. Oxytocin and the initiation of human parturition. II stimulation of prostaglandin production in human decidua by oxytocin. *Am. J. Obst. Gynecol.*, **141**: 694-697, 1981.
- FUCHS, A. R.; PERIYASAMY, S.; ALEXANDROVA, M. e SOLOFF, M. S. Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium. Effects of ovarian steroid. *Endocrinology*, **113**: 742-749, 1983.
- FUCHS, A.R. e FUCHS, F. Endocrinology of human parturition. A review. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, **91**: 948, 1984.
- FUCHS, A. R.; FUCHS, F.; HUSSLEIN, P. e SOLOFF, M. S. Oxytocin receptor in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **150**: 734-741, 1984.
- FUCHS, A. R.; BEHRENS, O.; HELMER, H.; LIU, C. H.; BARROS, C. M. e FIELDS, M. J. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous and early pregnancy. *Endocrinology*, **127**: 629-636, 1990.

- FUKAI, H.; DEN, K.; SAKAMOTO, H.; KODAIRA, H.; UCHIDA, F. e TAKAGI, S. Study of oxytocin receptor. II. Oxytocin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptors in human myometria and amnion-decidua complex during pregnancy and labor. *Endocrinol. Jpn.*, **31**: 565-570, 1984.
- GANT, N. F.; DALEY, G. L.; CHAND, S.; WHALLEY, P. J. e MacDONALD, P. C. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J. Clin. Invest.*, **52**: 2682-2689, 1973.
- GANT, N. F.; WHALLEY, P. J.; EVERETT, R. B.; WORLEY, R. J. e MacDONALD, P. C. Control of vascular reactivity in pregnancy. *Am. J. Kidney Dis.*, **9**: 303-307, 1987.
- GARFIELD, R. E. Cellular and molecular bases of dystocia. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **30**: 3-6, 1982.
- GARFIELD, R. E. BLENNERHASSETT, M. G. e MILLER, S. M. Control of myometrial contractility: role and regulation of gap junction. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, **10**: 436-490, 1988.
- GARFIELD, R.E. e BEIER, S. Increased myometrial responsiveness to oxytocin term and preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **161**: 545-561, 1989.
- GARRIOCH, D. B. The effect of indomethacin on spontaneous activity in the isolated human myometrium and on the response to oxytocin and prostaglandin. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **85**: 47-52, 1978.
- GEORGE, J. M. Immunoreactive vasopressin and oxytocin. Concentration in individual human hypothalamic nuclei. *Science*, **200**: 342-343, 1978.
- GERMAIN, A. M.; SMITH, J.; CASEY, M. L. e MacDONALD, P. C. Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: uterotonic degradation. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **78**: 463-470, 1994.

- GOLDBERG, V. J. e RAMWELL, P. W. The role of prostaglandins in reproduction. In: *Frontiers in reproduction and fertility control*, Greep, R. O. e Koblinsky, M. A. (eds.) MIT Press, Cambridge, Mass., pp. 219-235, 1977.
- GONG, Q.Y.; CHEN, L.A.; LI, J.Z.; XU, W.H. e YANG, Z.C. Effects of endothelin-1 on isolated uterine horns in estrogen-primed and pregnant mice. *Acta. Pharmacol. Sin.* **15**: 129-132, 1994.
- GOODMAN, R.P.; KILLAM, A. P.; BRASH, A. R. e BRANCH, R. A. Prostacyclin production during pregnancy: a comparison of production during normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension. *Am J. Obstet. Gynecol.*, **142**: 817-822, 1982.
- GORODESKI, G. I.; SHEEAN, L. A. e UTIAN, W. H. Disparate myometrial contractility in the pregnant rat. *Biol. Reprod.*, **38**: 144-148, 1988.
- GORODESKI, G.I.; SHEEAN, L.A. e UTIAN, W.H. Myometrial oxytocin receptors levels in the pregnant rat are higher in distal than in proximal portion of the horn and correlate with disparate oxytocin responsive myometrial contractility in these segments. *Endocrinology* **127**: 1136-1143, 1990.
- GOUREAU, O.; TANFIN, Z.; MARC, S. e HARBON, S. Diverse prostaglandin receptors activate distinct signal transduction pathways in rat myometrium. *Am. J. Physiol.*, **263**:C257-C265, 1992.
- GU, W.; RICE, G. E. e THORBURN, G. D. Prostaglandin E₂ and F_{2α} in mid-pregnant and at parturition. *Prost. Leucotr. Essen. Fatty Acids*, **40**: 27-30, 1990.
- HAHLIN, M.; DENNEFORS, B.; JOHANSON, C. e HAMBERGER, L. Luteotropic effects of prostaglandin E₂ on the human corpus luteum of the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**: 909-914, 1988.

- HALL, M. M. Prostaglandin synthesis inhibitors: effect on angiotensin-II and oxytocin-induced contractions in rat uterine smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **79**: 121-124, 1983.
- HEMSÉN, A.; GILLIS, C.; LARSSON, O.; HAEGERSTRAND, A. e LUNDBERG, J. M. Characterization, localization and actions of endothelin in umbilical vessels and placenta of man. *Acta Physiol. Scand.*, **143**: 395-404, 1991.
- HERCZ, P. Quantitative changes in steroid and peptide hormones in the maternal-fetoplacental system between the 28th-40th weeks of pregnancy. *Acta Med. Hung.*, **42**: 29-39, 1985.
- HERTELENDY, F.; MOLNÁR, M. e RIGÓ, J. J. Proposed signaling role of arachidonic acid in human myometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **110**: 113-118, 1995.
- HIGUCHI, T.; LIU, C. X.; SAITO, H.; NEGORO, H. e MATSUKAWA, S. Effects of ovarian steroid hormones and the presence of the fetus on oxytocin gene expression in the uterus. *J. Endocrinol.*, **146**: 81-85, 1995.
- HOFMANN, G. E.; RAO, C. H. V.; BARROWS, G. H. e SANFILIPPO, J. S. Topography of human uterine prostaglandin E and F_{2α} receptors and their profiles during pathological state. *J. Clin. Endocrinol.*, **57**: 360-366, 1983.
- HORWITZ, M. J.; CLARKE, M. R.; KANBOUR-SHAKIR, A. e AMICO, J. A. Developmental expression and anatomical localization of endothelin-1 messenger ribonucleic acid and immunoreactivity in the rat placenta: a northern analysis and immunohistochemistry study. *J. Lab. Clin. Med.*, **125**: 713-718, 1995.
- HUGGINS, J. P.; PELTON, J. T. e MILLER, R. C. The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmac. Ther.*, **59**: 55-123, 1993.

- HUGHES, S. J. e HOLLINGSWORTH, M. The lack of a role for potassium channel opening in the action of relaxin in the rat isolated uterus; a comparison with levcromakalim and salbutamol. *Br. J. Pharmacol.*, **117**: 1435-1442, 1996.
- HUSSLEIN, P.; FUCHS, A.R.; SOLOFF, M.S. e FUCHS, F. Does fetal oxytocin initiate human labour? A hypothesis. *Geburtshilfe-frauenheilkd.* **42**: 579-582, 1982.
- HYSLOP, S. e de NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.*, **26**: 223-242, 1992.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MYAUCHI, T.; GOTO, K. e MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 2863-2867, 1989.
- ISHIKAWA, M e FUCHS, A. R. Effects of epinephrine and oxytocin on release of PGF_{2α} from rat uterus *in vitro*. *Prostaglandins*, **15**: 89-101, 1978.
- IZUMI, H.; BYAMSMITH, M. e GARFIELD, R.E. Gestational changes in oxytocin-and endothelin-1-induced contractility of pregnancy rat myometrium. *Eur. J. Pharmacol.* **278**: 187-194, 1995.
- JAING, Y.; SINGH, A. K.; KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. e SHEW, R. L Isolation of nitric oxide synthase in the rat uterus. *Life Sci.*, **58**: 1009-1014, 1996.
- JONES, S. A. e CHALLIS, J. R. Steroid, corticotrophin-releasing hormone, ACTH and prostaglandin interactions in the amnion and placenta of early pregnancy in man. *J. Endocrinol.*, **125**: 153-159, 1990.

- JOUANEN, A.; SAINTOT, M.; THALER-DAO, H. e De PAULET, A. C. Prostaglandin synthesis from endogenous and exogenous arachidonic acid in the rat uterus. Effect of estradiol and progesterone. *Prostaglandins Leukot. Med.*, **18**: 321-336, 1985.
- KAMM, K. e STULL, J. T. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu. Rev. Physiol.*, **51**: 299-313, 1989.
- KANYICSKA, B. BURNIS, T. P. e FREEMAN, M. E. Endothelin-3 inhibits prolactin and stimulates LH, FSH and TSH secretion from pituitary cell culture. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **174**: 338-343, 1991.
- KAO, C. Y. Electrophysiological properties of the uterine smooth muscle. In: *Biology of the uterus*, 2 ed., Wynn, R. M. (ed.) Plenum Press, New York, pp. 423-496, 1977.
- KARNE, S.; JAYAWICKREME, C. e 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.
- KHAC, L. D.; MOKHTARI, A.; RENNER, M. e HARBON, S. Activation of beta-adrenergic receptors inhibits calcium entry-mediated generation of inositol phosphates in the guinea pig myometrium, a cyclic AMP-independent event. *Mol. Pharmacol.*, **41**: 509-519, 1992.
- KHALIFA, R. M.; SAYRE, B. L. e LEWIS, G. S. Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J. Anim. Sci.*, **70**: 1992.
- KHOUJA, A. e JONES, C. T. Measurement of arachidonic acid release from permeabilised myometrial cells of guinea pig uterus. *J. Dev. Physiol.*, **18**: 263-270, 1992a.

- KHOUJA, A. e JONES, C. T. Changes in phospholipase A₂ in myometrium of the guinea pig uterus during pregnancy. *J. Dev. Physiol.*, **18**: 271-277, 1992b.
- KIMURA, T.; AZUMA, C.; SAJI, F.; TAKEMURA, M.; TOKUGAWA, Y.; MIKI, M.; ONO, M.; MORI, K. e TANIZAWA, O. Estimulation by an electrophysiological method of the expression of oxytocin receptor mRNA in human myometrium during pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **42**: 253-258, 1992.
- KIMURA, T.; MAKINO, Y.; SAJI, F.; TAKEMURA, M.; INOUE, T.; KIKUCHI, T.; KUBOTA, Y.; AZUMA, C.; NOBUNAGA, T.; TOKUGAWA, Y. e TANIZAWA, O. Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. *Eur. J. Endocrinol.*, **131**: 385-390, 1994.
- KOZUKA, M.; ITO, T.; HIROSE, S.; TAKAHASHI, K. e HAGIWARA, H. Endothelin induces two types of contraction of rat uterus: phasic contraction by way of voltage-dependent calcium channels and developing contraction through a second type of calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**: 317-323, 1989.
- KRIGER, D. T. Placenta as a source of 'brain' and 'pituitary' hormones. *Biol. Reprod.*, **26**: 55-72, 1982.
- LAUDANSKI, T.; AKERLUND, M. e BATRA, S. Differences in the effects of vasopressin and oxytocin on rabbit myometrial activity and a possible mediation of prostaglandins. *J. Reprod. Fertil.*, **51**: 355-361, 1977.
- LEWIS, R. B. e SCHULMAN, J. D. Influence of acetylsalicylic acid, an inhibitor of prostaglandin synthesis, on the duration of human gestation and labour. *Lancet*, **2**: 1159-1165, 1973
- LIGGINS, G. C.; FAIRCLOUGH, R. J.; GRIEVES, S. A.; FORSTER, C. S. e KNOX, B. S. Parturition in the sheep. *Ciba. Found. Symp.*, **47**: 5-30, 1977.

LIGGINS, G. C. e THORBURN, G. D. Initiation of parturition. In: Marshall's physiology of reproduction. pp. 863-1002, Lamming, G. E. (ed.) Chapman and Hall, London, 1994.

MacDONALD, P. C. Parturition: biomolecular and physiological process. In: Williams obstetrics. pp. 297-361, Cunningham, F. G., Gant, N. F., MacDonald, P. C., Gilstrap, L. C. e Leveno, K. J. (eds.) Prentice-Hall, London, 1993.

MAGGI, M.; GENAZZANI, A.D.; GIANNINI, S.; TORRISI, C.; BALDI, E.; Di TOMASO, M.; MUNSON, P.J.; RODBARD, D.; SERIO, M. e Di TOMASO, M. Vasopressin and oxytocin receptors in vagina, myometrium, and oviduct of rabbits. *Endocrinology*, **122**: 2970-2980, 1988.

MAGGI, M.; Del CARLO, P.; FANTONI, G.; GIANNINI, S.; TORRISI, C.; CASPARIS, D.; MASSI, G. e SERIO, M. Human myometrium during pregnancy contains and responds to V_1 -vasopressin receptors as well as oxytocin receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**: 1142-1154, 1990.

MAGGI, M.; FANTONI, G.; PERI, A.; GIANNINI, S.; BRANDI, M.L.; ORLANDO, C. e SERIO, M. Steroid modulation of oxytocin/vasopressin receptors in the uterus. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **40**: 481-491, 1991.

MAGGI, M.; FANTONI, G.; PERI, A.; ROSSI, S.; BALDI, E.; MAGINI, A.; MASSI, G. e SERIO, M. Oxytocin-endothelin interaction in the uterus. *Regul. Pept.*, **45**: 97-101, 1993.

MAGGI, M.; VANNELLI, G.B.; FANTONI, G.; BALDI, E.; MAGINI, A.; PERI, A.; GIANNINI, S.; GLORIA, L.; DELCARLO, P.; CASPARIS, D.; TOMEI, T. e SERIO, M. Endothelin in the human uterus during pregnancy. *J. Endocrinol.*, **142**: 385-396, 1994.

- MAHER, E.; BARDEQUEZ, A.; GARDNER, J. P.; GOLDSMITH, L.; WEISS, G.; MASCARINA, J. e AVIV, A. Endothelin- and oxytocin-induced calcium signalling in cultured human myometrial cells. *J. Clin. Invest.*, **87**: 1251-1258, 1991.
- MAJKIC' -SINGH, N.; VUKOVIC', A.; SPASIC', S.; RUZIC, A.; STOJANOV, M. e BERKÉS, I. Oxytocinase (CAP) activity in serum during normal pregnancy. *Clin. Biochem.*, **15**: 152-153, 1982.
- MARSH, M. M.; BUTT, A. R.; RILEY, S. C.; ROGERS, P. A. W.; SUSIL, B.; AFFANDI, B.; FINDLAY, J. K. e SALAMONSEN, L. A. Immunolocalization of endothelin and neutral endopeptidase in the endometrium of users of subdermally implanted levonorgestrel (Norplant®). *Human Reproduction*, **10**: 2584-2589, 1995.
- MARSHALL, J. M. Regulation of activity of uterine smooth muscle. *Physiol. Rev.*, **42**: 213, 1962.
- MASAKI, T.; VANE, J. R. e VANHOUTTE, P. M. V. International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**: 137-142, 1994.
- MASFERRER, J. L. e SEIBERT, K. Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor*, **4**: 25-30, 1994.
- MILVAE, R. A. Role of luteal prostaglandins in the control of bovine corpus luteum function. *J. Anim. Sci.*, **62**: 72-78, 1986.
- MITCHELL, M. D. The regulation of decidual prostaglandin biosynthesis by growth factors, phorbol esters and calcium. *Biol. Reprod.*, **44**: 871-874, 1991.
- MITCHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J. e VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 11693-11697, 1993.

- MOLNÁR, M. e HERTELENDY, F. PGF_{2α} and PGE₂ binding to rat myometrium during gestation, parturition and postpartum. *Am. J. Physiol.* **258**: E740-E747, 1990a.
- MOLNÁR, M. e HERTELENDY, F. Regulation of intracellular calcium in human myometrial cells by prostaglandin F_{2α}: comparison with oxytocin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**: 1243-1250, 1990b.
- MOLNÁR, M. e HERTELENDY, F. Signal transduction in rat myometrial cells: Comparison of the action of endothelin-1, oxytocin and prostaglandin F_{2α}. *Eur. J. Endocrinol.*, **133**: 467-474, 1995.
- MOORE, S.; BURKE, S.; SLATER, D. e MYATT, L. Expression of prostaglandin-H synthase isoforms in human myometrium at parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, *in press*.
- MORISHITA, T.; NOZAKI, M.; SANO, M.; YOKOYAMA, M.; NAKAMURA, G. e NAKANO, H. Changes in phospholipase A₂ activity of the rabbit ampullary epithelium by ovarian steroids. *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids*, **48**: 315-318, 1993.
- MYATT, L.; LANGDON, G. e BROCKMAN, D. E. Identification and changes in concentrations of prostaglandin H synthase (PGHS) isoforms in rat myometrium at parturition. *Prostaglandins*, **48**: 285-296, 1994.
- NATUZZI, E. S.; URSELL, P. C.; HARRISON, M.; BUSCHER, C. e RIEMER, R. K. Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**: 1-8, 1993.
- NELSON, S. H. e STEINSLAND, O. S. Endothelium-dependent increase in sensitivity to acetylcholine (ACH) in human uterine arteries during pregnancy. *Blood Vessels*, **24**: 218-219, 1987.

- NELSON, S. H.; STEINSLAND, O. S. e SURESH, M. S. Possible physiological role of calcitonin gene-related peptide in the human uterine artery. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **168**: 605-611, 1993.
- NEULEN, J. e BRECKWOLDT. Placental progesterone, prostaglandins and mechanisms leading to initiation of parturition in the human. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **102**: 195-202, 1994.
- NISELL, H.; HJEMDAHL, P. e LINDE, B. Cardiovascular responses to circulating catecholamines in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Clin. Physiol.*, **5**: 479-493, 1985.
- NISELL, H.; WOLFF, K.; HEMSÉN, A.; LINDBLUM, N.; LUNELL, N. O. e LUNDBERG, J. M. Endothelin, a vasoconstrictor important to the uteroplacental circulation in preeclampsia? *J. Hypertens.*, **9**: 168-169, 1991.
- NORJAVAARA, E. e ROSBERG, S. Mechanism of action of prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced luteolysis: evidence for a rapid effect on the guanine nucleotide binding regulatory component of adenylate cyclase in rat luteal tissue. *Mol. Cell Endocrinol.*, **48**: 97-104, 1986.
- NORSTRÖM, A.; ANDERSSON, A. e VILHARDT, H. Contractile effect of oxytocin and 1-deamino-1-carba-2-tyrosine (0-methyl)-oxytocin in myometrial tissue from non-pregnant and term pregnant women. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*, **122**: 566-568, 1990.
- OKAWA, T.; SUZUKI, Y.; ENDO, C.; HOSHI, K.; SATO, A. e NAKANISHI, H. The influence of prostaglandins on the contractile response to electrical field stimulation in rabbit myometrial and cervical smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **230**: 341-348, 1993.

- PAIRET, M. e ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **10**: 1-15, 1996.
- PAPKA, R. E. e McNEILL, D. L. Distribution of NADPH-diaphorase-positive nerves in the uterine cervix and neurons in dorsal root and paracervical ganglia of the female rat. *Neurosci. Lett.*, **147**: 224-248, 1992.
- PEDROZA, E. e ROSHER, J. M. Some characteristics of in vivo ^3H -estradiol binding by the rat posterior hypophysis. *Neuroendocrinology*, **19**: 193-198, 1975.
- PERI, A.; VANNELLI, G.B.; FANTONI, G.; GIANNINI, S.; BARNI, T.; ORLANDO, C.; SERIO, M. e MAGGI, M. Endothelin in rabbit uterus during pregnancy. *Am. J. Physiol.* **263**: E158-E167, 1992.
- PETERSEN, L. K.; SVANE, D.; ULDBJERG, N. e FORMAN, A. Effects of human relaxin on isolated rat and human myometrium and uteroplacental arteries. *Obstet. Gynecol.*, **78**: 757-762, 1991.
- QUAAS, L.; GÖPPINGER, A. e ZAHRANDNIK, H. P. The effect of acetylsalicylic acid and indomethacin on the catecholamine- and oxytocin-induced contractility and prostaglandin (6-keto-PGF_{1 α} , PGF_{2 α})-production of human pregnancy myometrial strips. *Prostaglandins*, **34**: 257-269, 1987.
- RAE, G. A.; CALIXTO, J. B. e D'ORLÉANS, P. Big-endothelin-1 contracts rat isolated uterus via a phosphoramidon-sensitive endothelin ET_A receptor-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, **240**: 113-119, 1993.
- RAE, G. A.; CALIXTO, J. B. e D'ORLÉANS-JUSTE, P. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. *Reg. Pept.*, **55**: 1-46, 1995.

- RAJABI, M. R. e CYBULSKY, A. V. Phospholipase A₂ activity is increased in guinea pig uterine cervix in late pregnancy and at parturition. *Am. J. Physiol.*, **269**: E940-E947, 1995.
- RESINK, T. J.; SCOTT-BURDEN, T. e 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. e 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.
- RILEY, S. C.; BUTT, A. R.; DOUGHTON, B. W.; LI, S. X.; ZHENG, S. H.; FINDLAY, J. K. e SALAMONSEN, L. A. Endothelin in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, **100**: 451-459, 1994.
- RIEMER, R. K.; GOLDFIEN, A. C.; GOLDFIEN, A. e ROBERTS, J. M. Rabbit uterine oxytocin receptors and in vitro contractile response: abrupt changes at term and role of eicosanoids. *Endocrinology*, **119**: 699-709, 1986.
- ROBERTS, J. S. e McCracken, J. A. Does prostaglandin F_{2α} released from the uterus by oxytocin mediate the oxytocic action of oxytocin? *Biol. Reprod.*, **15**: 457-463, 1976.
- ROBINSON, A. G. Isolation, assay and secretion of individual human neurophysins. *J. Clin. Invest.*, **55**: 360-367, 1975.
- RONCO, P.; POLLARD, H.; GALCERAN, M.; DELAUCHE, M.; SCHWARTZ, J. C. e VERROUST, P. Distribution of enkephalinase (membrane metalloendopeptidase E.C. 3.4.24.11) in rat organs. *Lab. Invest.*, **58**: 210-217, 1988.

- ROQUES, B. P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. -C. e BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **45**: 87-138, 1993.
- RUZYCKY, A. e CRANKSHAW, D. J. Role of inositol phospholipid hydrolysis in the initiation of agonist-induced contraction of rat uterus: effects of foination by 17 beta-estradiol and progesterone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **66**: 10-17, 1988.
- SAIJIONMAA, O.; LAATIKAINEN, T. e WAHLSTROM, T. Corticotrophin-releasing factor in human placenta: localization, concentration and release in vitro. *Placenta*, **9**: 373-385, 1988.
- SAKATA, K.; OZAKI, H.; KWON, S.-C.; KARAKI, H. Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium levels of varios types of smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 483-492, 1989.
- SAKATA, K. e KARAKI, H. Effects of endothelin on cytosolic Ca^{+2} level and mechanical activity in rat uterine smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **221**: 9-15, 1992.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K. e MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**: 732-735, 1990.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; INOUE, A.; RYAN, U. S.; KIMURA, S.; MITSUI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 44-47, 1991.
- SAMSON, W. K.; SKALA, K. D.; ALEXANDER, B. D. e HUANG, F.-L.S. Pituitary site of action of endothelin: selective inhibition of prolactin release in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**: 737-743, 1990.

- SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D. e MEYER, H. H. Sequences of pituitary, ovarian and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **37**: 277-286, 1989.
- SCHIFF, E.; BEN-BARUCH, G.; GALRON, R.; MASHIACH, S. e SOKOLOVSKY, M. Endothelin-1 receptors in the human myometrium: evidence for different binding properties in post-menopausal as compared to premenopausal and pregnant women. *Clin. Endocrinol.*, **38**: 321-324, 1993.
- SCHREY, M. P. CORNFORD, P. A.; READ, A. M. e STEER, P. J. A role for phosphoinositide hydrolysis in human uterine smooth muscle during parturition. *Am. J. Gynecol.*, **159**: 964-970, 1988.
- SELLERS, S. M.; HODGSON, H. T.; MITCHEL, M. D.; ANDERSON, A. B. e TURNBULL, A. C. Raised prostaglandin levels in the third stage of labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **144**: 209-212, 1982.
- SENIOR, J.; SANGHA, R.; BAXTER, G. S.; MARSHALL, K. e CLAYTON, J. K. In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP receptors in the non pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 215-221, 1992.
- SENIOR, J.; MARSHALL, K.; SANGHA, R. e CLAYTON, J. K. In vitro characterization of prostanoid receptors on human myometrium at term pregnancy. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 501-506, 1993.
- SHERWOOD, O. D.; DOWNING, S. J.; GUICO-LAMM, J. J.; O'DAY-BOWMAN, M. B. e FIELDS, P. A. The physiological effects of relaxin during pregnant studies in rats and pigs. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, **15**: 143-189, 1993.
- SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M. e TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18275-18278, 1994.

- SIERRA, E. M e TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Effects of low-level lead exposure on hypothalamic hormones and serum progesterone levels in pregnant guinea pigs. *Toxicology*, **72**: 89-97, 1992.
- SILVER-KHODR, T. M. e KHODR, G. S. Content of luteinizing hormone-releasing factor in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **130**: 216-219, 1977.
- SNEDECOR, G. W. e COCHRAN, W. G. Statistical methods., Ames, Iowa State University Press, 1967.
- SNYDER, S. W.; RIGBY, S. L. e ADAMS, H. R. Evidence for decidual modulation of contractile function in the pregnant rat uterus. *Life Sci.*, **55**: 399-411, 1994.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signalling. *Pharmac. Ther.*, **54**: 129-149, 1992.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.*, **68**: 435-471, 1995.
- SOLLOFF, M.S.; SCHROEDER, B.; CHAKRABORTY, J. e PEARLMUTTER, A.F. Characterization of oxytocin receptors in the uterus and mammary gland. *Fed. Proc.*, **36**: 1861-1866, 1977.
- SOLLOFF, M. S. Regulation of oxytocin action at the receptor level. *Life Sci.*, **25**: 1453, 1979.
- STOJIKOVIC, S. S.; MERELLI, F.; IIDA, T.; KRSMANOVIC, L. Z. e CATT, K. J. Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science*, **248**: 1663-1666, 1990.
- SUMIDA, C.; GELLY, C. e PASQUALINI, J. R. Dynamics and control of progesterone receptor synthesis in the fetal uterus of the guinea-pig in organ culture. *J. Endocrinol.*, **105**: 415-421, 1985.

- SUNNERGREN, K. P.; WORD, R. A.; SAMBROOK, J. F.; MacDONALD, P. C. e VASEY, L. M. Expression and regulation of endothelin precursor mRNA in avascular human amnion. *Mol. Cell Endocrinol.*, **68**: R7-R14, 1990.
- SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; HONDA, A.; HAYASHI, Y.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A. e NARUMIYA, S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. *J. Biol. Chem.*, **267**: 6463-6466, 1992.
- SUZUKI, H. e KURIYAMA, H. Effects of PGE₂ on the electrical property of the pregnant mouse myometrium. *Jpn. J. Physiol.*, **25**: 201-215, 1975.
- SVANE, D.; LARSSON, B.; ALM, P.; ANDERSSON, K. E. e FORMAN, A. Endothelin-1: immunocytochemistry, localization of binding sites and contractile effects in human utero placental smooth muscle. *Am. J. Obstet.-Gynecol.*, **168**: 233-241, 1993.
- SWAHN, M. L. e BYGDAMAN, M. The effect of the antiprogesterin RU 486 on uterine contractility and sensitivity to prostaglandin and oxytocin. *Br. J. Obstet Gynaecol.*, **95**: 126-134, 1988.
- SWANSON, M. L.; LEI, Z. M.; SWANSON, P. H.; RAO, C. V.; NARUMIYA, S. e HIRATA, M. The expression of thromboxane A₂ synthase and thromboxane A₂ receptor gene in human uterus. *Biol. Reprod.*, **47**: 105-117, 1992.
- TABB, T.; THILANDER, G.; GROVER, A.; HERTZBERG, E. e GARFIELD, R. An immunochemical and immunocytologic study of the increase in myometrial gap junction (and connexin 43) in rats and humans during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **167**: 559-567, 1992.
- TAKAYAMA, T. Effects of prostaglandins on the contractile mechanism, especially on an intracellular calcium store in uterine smooth muscle cells. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi*, **22**: 31-42, 1986.

- TASAKA, K.; MASUMOTO, N.; MIYAKE, A. e TANIZAWA, O. Direct measurement of intracellular free calcium in cultured human puerperal myometrial cells stimulated by oxytocin: effects of extracellular calcium and calcium channel blockers. *Obstet. Gynecol.*, **77**: 101-106, 1991.
- TENCE, M.; GUILLON, G.; BOTTARI, S. e JARD, S. Labelling of vasopressin and oxytocin receptors from human uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, **191**: 427-436, 1990.
- THORBURN, G. D.; CHALLIS, J. R. J. e ROBINSON, J. S. Endocrine control of parturition. In *Biology of the uterus*, pp. 653-662, Wynn, R. M. (ed). Plenum Press, New York, 1977.
- THORBURN, G. D.; PARKINGTIN, H. C.; RICE, G. E.; JENKIN, G.; HARDING, R.; SIGGER, J.; RALPH, M.; SHEPHERD, V. e MYLES, K. Regulation of electrical activity in the myometrium of the pregnant ewe. In: *The endocrine control of fetus*, pp. 391-400, Kunzel, W e Jensen, A. (eds.) Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- THORNER, M. O.; VANCE, M. L.; HORVATH, E. e KOVACS, K. The anterior pituitary. In: *Williams textbook of endocrinology*, pp. 221-310, Wilson, J. D. e Foster, D. W. (eds.) Saunders Co., Philadelphia, 1992.
- THORNTON, S.; GILLESPIE, J. I.; GREENWELL, J. R. e DUNLOP, W. Mobilization of calcium by the brief application of oxytocin and prostaglandin E₂ in single cultured human-myometrial cells. *Exp. Physiol.*, **77**: 293-305, 1992.
- TULCHINSKY, D.; HOBEL, C. J.; YEAGER, E. e MARSHALL, J. R. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **112**: 1095-1100, 1972.
- USUKI, S.; SAITH, T.; SUZUKI, N.; KITADA, C.; GOTO, K. e MASAKI, T. Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate ovarian steroidogenesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**: S256-S259, 1991.

- VALENZUELA, G. J.; HEWITT, C. W. e DUCSAY, C. A. Endothelin 1 potentiates the in vitro contractile response of pregnancy human myometrium to oxytocin. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **172**:1573-1576, 1995.
- VANE, J. R. e WILLIAMS, K. I. The contribution of prostaglandin production to contractions of the isolated uterus of rat. *Br. J. Pharmacol.*, **48**: 629-639, 1973.
- VANE, J. R. e BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Rheumatol.*, **25**(Suppl 102): 9-21, 1996.
- VASILENKO, P. e MEAD, J. P. Growth-promoting effects of relaxin and related compositional changes in the uterus, cervix and vagina of the rat. *Endocrinology*, **120**: 1370-1376, 1987.
- VIERHAPPER, H. NOWOTNY, P. e WALDHÄUS, W. Effect of endothelin-1 in man: impact on basal and adrenocorticotropin-stimulated concentrations of aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**: 948-951, 1995.
- WARSOP, H.; KHOUJA, A.; WICHELHAUS, D. P. e JONES, C. T. Changes in uterine G-protein content during pregnancy in the guinea pig. *J. Dev. Physiol.*, **19**: 91-97, 1993.
- WATKINS, W. B. e MOORE, L. G. Effect of systemic intravenous infusion of PGF-2 α on the release of oxytocin-associated neurophysin from the ovary in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, **80**: 105-112, 1987.
- WEINSTEIN, D.; PFEIFER, Y.; SADOVSKY, E.; POLISHUK, W. Z. e SULMAN, F. G. Effects of indomethacin and cyproheptadine on onset labour in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **226**: 172-176, 1977.
- WEIR, R. J. BROWN, J. J. e FRASED, R. Relationship between plasma renin, renin-substrate, angiotensin II, aldosterone and electrolytes in normal pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **40**: 108-115, 1975.

- WEISS, G. The production and function of ovarian relaxin. In: The primate ovary, Stouffer, R. L. (ed.) Plenum Press, New York, pp. 223-236, 1987.
- WHALLEY, E.T. The action of bradikinin and oxytocin on the isolated whole uterus and myometrium of the rat in oestrus. *Br. J. Pharmacol.*, **64**: 21-28, 1978.
- WHALLEY, E. T. e WHITE, S. K. Effect of PGF_{2 α} , PGE₂ and IC1810008 on the *in vivo* and *in vitro* uterus of non-pregnant rats and guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **69**: 309P, 1980.
- WHITEAKER, S. S.; MIRANDO, M. A.; BECKER, W. C. e HOSTETLER, C. E. Detection of functional oxytocin receptors on endometrium of pig. *Biol. Reprod.*, **51**: 92-98, 1994.
- WIKLAND, M.; LINDBLOM, B.; WILHELMSSON, L. e WIQVIST, N. Oxytocin, prostaglandin and contractility of the human uterus at term pregnancy. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, **61**: 467-472, 1982.
- WIKLAND, M.; LINDBLOM, B.; HAMMARSTROM, S. e WIQVIST, N. The effect of prostacyclin on the term pregnant human myometrium. *Prostaglandins*, **26**: 905-916, 1983.
- WIKLAND, M.; LINDBLOM, B. e WIQVIST, N. Myometrial response to prostaglandins during labor. *Gynecol. Obstet. Invest.*, **17**: 131-138, 1984.
- WILSON, L. J.; STANISC, D.; KHAN-DAWOOD, F. e DAWOOD, M.Y. Alterations in reproductive tissue prostaglandins .E. and F, .6-keto-prostaglandin F_{1 α} and tromboxane B₂ with gestational age in the rat. *Biol. Reprod.*, **27**: 1207-1215, 1982.
- WILSON, L. J. e LINDSEY, R. Effects of progesterone withdrawal on uterine levels in the ovariectomized pregnant rat. *Prostaglandins Leukot. Med.*, **29**: 95-105, 1987.

- WILSON, T.; LIGGINS, G.C. e WHITTAKER, D.J. Oxytocin stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandin $F_{2\alpha}$ from human decidual cells. *Prostaglandins*, **35**: 771-780, 1988.
- WINDMOLLER, R.; LYE, S.J. e CHALLIS, J.R. Estradiol modulation of ovine uterine activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **61**: 722-728, 1983.
- WINGERUP, L.; ANDERSSON, K. E. e ULMSTEN, U. Ripening of the uterine cervix and induction of labour at term with prostaglandin E_2 in viscous gel. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **57**: 403-406, 1978.
- WIQVIST, N.; BRYMAN, I.; LINDBLOM, B.; NORSTRÖM, A. e WIKLAND, M. The role of prostaglandins for the coordination of myometrial forces during labour. *Acta Physiol. Hung.*, **65**: 313-322, 1985.
- WOLF, J. P.; SINOSICH, M.; ANDERSON, T. L.; ULMANN, A.; BAULIEU, E. E. e HODGEN, G. D. Progesterone antagonist (RU 486) for cervical dilation, labor induction and delivery in monkeys: effectiveness in combination with oxytocin. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **160**: 45-47, 1989.
- WOLFF, K.; NISELL, H.; MODIN, A.; LUNDBERG, J. M.; LUNELL, N. O. e LINDBLOM, B. Contractile effects of endothelin 1 and endothelin 3 on myometrium and small intramyometrial arteries of pregnant women at term. *Gynecol. Obstet. Invest.*, **36**: 166-171, 1993.
- WOLFF, K. Endothelin and endothelin-receptors in human pregnancy and delivery. *Repro Print AB*, Stockholm, 1996.
- WOLFF, K.; FAXÉN, M.; LUNELL, N. O.; NISELL, H. e LINDBLOM, B. Endothelin receptor ET_A and ET_B gene expression in human non-pregnant, term pregnant and preeclamptic uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*; *in press*.

- WOLLBERG, Z.; BOUSSO-MITTLER, D.; BDOLAH, A.; KLOOG, Y.; KOCHVA, E. e SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: effects on motility, binding properties and phosphoinositide hydrolysis during the estrous cycle of the rat uterus. *J. Bas. Clin. Physiol. Pharmacol.*, **3**: 41-57, 1992.
- WORD, R. A.; KAMM, K. E.; STULL, J. T. e CASEY, M. L. Endothelin increases cytoplasmatic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **162**: 1103-1108, 1990.
- WORD, R.A.; KAMM, K.E.; CASEY, M.L. Contractile effects of prostaglandins, oxytocin, and endothelin-1 in human myometrium in vitro: Refractoriness of myometrial tissue of pregnant women to prostaglandins E₂ and F_{2α}. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**: 1027-1032, 1992.
- XU, D.; EMOTO, N.; GIAID, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DeWITT, D. e YANAGISAWA, M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell*, **78**: 473-485, 1994.
- YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E. e BYAM-SMITH, M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology*, **133**: 1899-1902, 1993.
- YALLAMPALLI, C. e GARFIELD, R.E. Uterine contractile responses to endothelin receptors are elevated during labor. *Biol. Reprod.* **51**: 640-645, 1994.
- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415, 1988.
- YANG, M. C.; TU, M. S.; CHOU, C. K.; HONG, C. Y. e KUO, J. S. cAMP and vascular action of endothelin. *Pharmacology*, **42**: 252-256, 1991.

- YERDLEY, H. L.; COLEMAN, R. A.; MARSHALL, K. e SENIOR, J. The effects of PGE₂, sulprostone and AH13205 on hamster uterus *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 817-824, 1992.
- ZDUNCZYK, S. e JANOWSKI, T. The significance of steroid hormones and prostaglandins for the expulsion of the afterbirth in cattle. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **96**: 143-146, 1989.
- ZUO, J.; LEI, Z. M.; RAO, C. V.; PIETRANTONI, M. e COOK, V. D. Differential cyclooxygenase-1 and -2 gene expression in human myometria from preterm and term deliveries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**:894-899, 1994.