

**JANICE KOEPP**

**EFEITOS DA ENDOTELINA-1 NOS DUCTOS BILIARES EXTRA-  
HEPÁTICO E NO ESFÍNCTER DE ODDI ISOLADOS DE COBAIA**

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

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

**Florianópolis - SC**

**2000**


**“EFEITOS DA ENDOTELINA-1 NOS DUCTOS BILIARES  
EXTRA-HEPÁTICOS E NO ESFÍNCTER DE ODDI ISOLADOS  
DE COBAIA”.**


**POR**

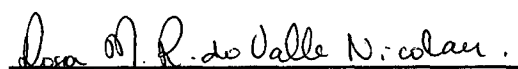
**JANICE KOEPP**

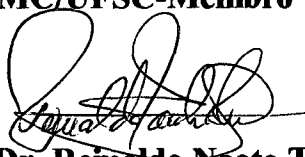
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Giles Alexander Rae**  
**(FMC/UFSC-Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Catarina Segreti Porto**  
**(EPM/UNIFESP -Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau**  
**(FMC/UFSC-Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Remaldo Naoto Takahashi**  
**Coordenador do Programa de**  
**Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 29 de Setembro de 2000.**

KOEPP, Janice. **Efeitos da endotelina-1 nos ductos biliares extra-hepáticos e no esfíncter de Oddi isolado de cobaia**. Florianópolis, 2000, 89 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae  
Defesa: 29/10/2000

Este estudo procurou avaliar os efeitos da [endotelina-1] (ET-1) na motilidade de diferentes porções do trato biliar extra-hepático isolado de cobaia. Os resultados obtidos revelaram que a ET-1 (0,1 a 100 nM) não causou qualquer resposta contrátil do ductos hepático e cístico ou da porção proximal do [ducto biliar comum] (DBC), assim como, estas preparações não responderam a colecistocinina-8 (CCK-8; 0,1 a 100 nM), a histamina, ao carbacol (10 nM a 100 µM) ou ao KCL 80 mM. Embora o carbacol e a CCK-8 causaram contrações da porção distal do DBC, a ET-1 não causou qualquer resposta contrátil desta porção. A indometacina (5,6 µM) não alterou a reatividade da porção distal do DBC à CCK-8, mas potencializou as resposta ao carbacol e revelou efeitos contráteis da ET-1. A ET-1, a sarafotoxina S6c(0,1 a 100 nM) e a histamina (10 nM a 100 µM) não induziram qualquer efeito contrátil das porções ampular (EOA) e papilar (EOP) do [esfíncter de Oddi]. Em contraste, o carbacol induziu contrações de ambas as porções do EO e a CCK-8 causou apenas pequenas contrações transitórias. Diferentemente da CCK-8, a incubação das preparações com ET-1 ou sarafotoxina S6c causou inibição da contração induzida pelo carbacol em anéis de EOA, mas não EOP. A indometacina aboliu o efeito inibitório causado pela ET-1 (100 nM) sobre as contrações induzidas pelo carbacol no EOA. O [efeito depressor] da ET-1 no EOA foi parcialmente bloqueado pelo BQ-123 (antagonista ET<sub>A</sub>), inalterado pelo BQ-788 (antagonista ET<sub>B</sub>) e totalmente abolido com a incubação das preparações de EOA com ambos os antagonistas. Tais achados permitem concluir que a ET-1, *in vitro*, não causa qualquer efeito contrátil em nenhum dos ductos do trato biliar extra-hepático, mas inibe as contrações induzidas pelo carbacol no EOA. A síntese de [prostanóides] inibe um efeito contrátil direto da ET-1 na porção distal do ducto biliar comum e também bloqueia o efeito depressor, mediado por [receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>,] da ET-1 sobre as contrações induzidas pelo carbacol no EOA de cobaia.

Palavras-chave: [endotelina-1], [ducto biliar comum], [esfíncter de Oddi], [efeito depressor], [prostanóides], [receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>].

**“Quem, de três milênios.  
Não é capaz de se dar conta.  
Vive na ignorância, na sombra.  
À mercê dos dias, do tempo. “  
(Johann Wolfgang Von Goethe)**

***Aos meus pais, Nilva M.<sup>a</sup> Bertoldi Koepp e Raimundo Koepp***

***Pelo amor, formação e constante apoio.***

***Aos meus irmãos, Viviane, Cristiane e Marcelo***

***Pela amizade e incentivo***

***em todas as fases da minha vida.***

***Ao meu filho Ubirajara,  
capaz de trazer com seu sorriso  
alegria aos meus dias mais difíceis.***

## AGRADECIMENTOS

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

Aos professores do departamento de Farmacologia, CCB, UFSC, e em especial ao Dr. João B. Calixto e Jamil Asseruy pelo constante incentivo à pesquisa e à Reinaldo Takahashi pelo apoio.

Ao prof. Dr. Pedro D'Orléans-Juste, do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina, universidade de Sherbrooke, Canadá, pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, e em especial à Adenir Pereira e ao Pedro de Souza, pelo carinho e auxílio.

A Alcíbia Helena Mala Cardozo pela amizade e assessoria constantes.

À Anna Paula Piovezan, ao Cláudio Laurentino Guimarães e à Josélia Daher de Melo pelo excelente relacionamento e agradável clima de trabalho.

À todos os colegas da pós-graduação pela troca de informações e amizade, de modo especial à Sandra, Eunice, Márcia e George.

Ao amigo Ubirajara Duarte dos Santos, pelo tempo em que dividimos nossas vidas.

À Fábio Henrique Speck, pelo Amor concedido.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro, ainda que sem bolsa de mestrado.

## **LISTA DE ABREVIÇÕES**

- AC** – Adenilato Ciclase  
**ANOVA** – Análise de Variância  
**ATP** – Adenina Trifosfato  
**Cch** - Carbacol  
**CCK** – Colecistocinina  
**CCK-8** – Octapeptídeo C-terminal da colecistocinina  
**CE<sub>50</sub>** – Concentração Efetiva 50 %  
**CGRP** – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina  
**DG** – Diacilglicerol  
**DBC** – Ducto biliar Comum  
**DBC-D** – Ducto Biliar Comum Distal  
**DBC-P** – Ducto Biliar Comum Proximal  
**ECE** – Enzima Conversora de Endotelina  
**E<sub>MAX</sub>** – Efeito Máximo  
**EO** – Esfíncter de Oddi  
**EOA** – Esfíncter de Oddi Ampular  
**EOP**- Esfíncter de Oddi Papilar  
**EPM** – Erro Padrão da Média  
**ET** – Endotelina  
**ET-1** – Endotelina-1  
**IP<sub>3</sub>** – Inositol Trifosfato  
**min** - minuto  
**NANC** – Não Adrenérgico Não Colinérgico  
**NO** – Óxido Nítrico  
**PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PGF<sub>1α</sub>** - Prostaglandina F<sub>1</sub> alfa  
**PGF<sub>2α</sub>** - Prostaglandina F<sub>2</sub> alfa  
**PGI<sub>2</sub>** - Prostaciclina  
**S6c** – Sarafotoxina S6c  
**VB** – Vesícula Biliar  
**VIP** – Peptídeo Intestinal Vasoativo.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	<b>vii</b>
<b>SUMÁRIO DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xli</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 - As Endotelinas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 - Biossíntese das Endotelinas</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 - Receptores para Endotelinas</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 - Mecanismos Celulares Acoplados a Receptores</b> <b>Endotelinérgicos</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5 - Endotelinas no Trato Gastrointestinal</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6 - O Trato Biliar</b> .....	<b>14</b>
1.6.1. Endotelinas no trato biliar.....	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 - Animais</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 - Montagem das Preparações</b> .....	<b>23</b>
3.2.1. Ductos hepáticos, cístico e biliar comum isolados de cobaia.....	<b>23</b>
3.2.2. Esfíncter de Oddi isolado de cobaia.....	<b>25</b>
<b>3.3– Procedimentos Experimentais</b> .....	<b>25</b>
3.3.1. Ducto cístico e ducto hepático.....	<b>25</b>
3.3.2. Ducto biliar comum.....	<b>27</b>
3.3.3. Esfíncter de Oddi.....	<b>27</b>
<b>3.4– Apresentação dos Resultados e Análise Estatística</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5– Drogas, Sais e Soluções</b> .....	<b>29</b>

<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1–	<b>Ações induzidas pela endotelina-1 e outros agonistas nos ductos biliare extra-hepático isolados de cobaia .....</b>	<b>31</b>
4.2–	<b>Influência da indometacina sobre respostas do DBC-D de cobaia a diferentes agonistas .....</b>	<b>32</b>
4.3–	<b>Comparação dos efeitos induzidos pela endotelina-1 e outros agonistas no esfíncter de Oddi (EO) .....</b>	<b>36</b>
4.3.1.	<b>Influência da indometacina sobre a reatividade do esfíncter de Oddi ao carbacol, ET-1 e CCK-8.....</b>	<b>36</b>
4.3.2.	<b>Efeito depressor de ET-1 e da sarafotoxina S6c sobre as contrações induzidas pelo carbacol no EOA e EOP.....</b>	<b>37</b>
4.3.3.	<b>Influência da indometacina no efeito depressor da ET-1 no esfíncter de Oddi de cobaia.....</b>	<b>43</b>
4.3.4.	<b>Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos no efeito de pressor da endotelina-1 no EOA de cobaia..</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1.	<b>Efeitos da endotelina-1 e outros agonistas nos ductos do trato biliar extra-hepático.....</b>	<b>48</b>
5.2.	<b>Efeito da endotelina-1 no Esfíncter de Oddi.....</b>	<b>51</b>
5.3.	<b>Influência de eicosanóides da via da ciclooxigenase nas ações da ET-1 sobre a motilidade do trato biliar extra-hepático.....</b>	<b>56</b>
5.4.	<b>Implicações fisiológicas ou fisiopatológicas.....</b>	<b>58</b>
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Estrutura das endotelinas-1, -2 e -3 e da sarafotoxina S6c ....	<b>3</b>
<b>FIGURA 2</b> – Esquema da biossíntese da endotelina-1 .....	<b>7</b>
<b>FIGURA 3</b> – Ilustração esquemática do trato biliar extra-hepático e esfíncter de Oddi na cobaia .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 4</b> – Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, carbacol e CCK-8 em anéis de ducto biliar comum segmento proximal e distal de cobaia.....	<b>33</b>
<b>FIGURA 5</b> – Influência da indometacina na reatividade de anéis de ducto biliar comum distal de cobaia à endotelina-1, carbacol e CCK-8.....	<b>35</b>
<b>FIGURA 6</b> – Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis do carbacol, CCK-8 e ET-1 em anéis de esfíncter de Oddi porção ampular e papilar de cobaia.....	<b>38</b>
<b>FIGURA 7</b> – Curvas concebração-efeito médias aos efeitos contráteis do carbacol obtidos na ausência ou presença de indometacina em anéis da porção ampular ou papilar do esfíncter de Oddi isolado de cobaia.....	<b>39</b>
<b>FIGURA 8</b> – Registro isométrico típico dos efeitos induzidos pela exposição de anéis de esfíncter de Oddi porção ampular de cobaia à endotelina-1 na dose de 100 nM.....	<b>41</b>
<b>FIGURA 9</b> – Efeito inibitório da ET-1 e sarafotoxina S6c sobre as contrações induzidas pelo carbacol em anéis de esfíncter de Oddi porção ampular e papilar de cobaia.....	<b>42</b>
<b>FIGURA 10</b> – Efeito da CCK-8 sobre as contrações induzidas pelo carbacol em anéis de esfíncter de Oddi porção ampular e papilar de cobaia.....	<b>45</b>

<b>FIGURA 11 – Influência da indometacina sobre o efeito inibitório da endotelina-1 em anéis de esfíncter de Oddi porção ampular e papilar de cobaia.....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 12 – Influência do BQ-788, antagonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub>, e/ou BQ-123, antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub>, sobre o efeito depressor da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c nas contrações induzidas pelo carbacol em anéis de EOA de cobaia.....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da endotelina-1 (ET-1) na motilidade de diferentes porções do trato biliar extra-hepático isolado de cobaia. A ET-1 (0,1 a 100 nM) não causou qualquer resposta contrátil do ductos hepático e cístico ou da porção proximal do ducto biliar comum, assim como, estas preparações não responderam ao octapeptídeo C-terminal da colecistocinina (CCK-8; 0,1 a 100 nM), a histamina, ao carbacol (10 nM a 100  $\mu$ M) ou ao KCL 80 mM. Embora o carbacol e a CCK-8 icausaram contrações da porção distal do ducto biliar comum, a ET-1 não causou qualquer resposta contrátil desta porção. A indometacina (5,6  $\mu$ M) não alterou a reatividade da porção distal do ducto biliar comum à CCK-8, mas potencializou cerca de 500 vezes as resposta ao carbacol e desmascarou efeitos contráteis da ET-1 [ $CE_{50}$  7,8 nM (5,5-11,1);  $E_{MAX}$  80  $\pm$  6%]. A ET-1, a sarafotoxina S6c(0,1 a 100 nM) e a histamina (10 nM a 100  $\mu$ M) não induziram qualquer efeito contrátil das porções ampular (EOA) e papilar (EOP) do esfíncter de Oddi. Em contraste, o carbacol induziu contrações tônicas e rítmicas de ambas as porções do esfíncter de Oddi e a CCK-8 causou apenas pequenas contrações transitórias. Diferentemente da CCK-8, a incubação das preparações com ET-1 ou sarafotoxina S6c causou inibição da contração induzida pelo carbacol em anéis de EOA, mas não EOP. Na dose de 100 nM, as inibições causadas por ET-1 e sarafotoxina S6c foram 62,5  $\pm$  5 % e 45  $\pm$  9 %, respectivamente. A indometacina aboliu o efeito inibitório causado pela ET-1 (100 nM) sobre as contrações induzidas pelo carbacol no EOA, mas não desmascarou qualquer efeito contrátil do peptídeo no EOA ou no EOP. O efeito depressor da ET-1 no EOA foi parcialmente bloqueado pelo BQ-123 (1  $\mu$ M, um antagonista seletivo de receptores  $ET_A$ ),

inalterado pelo BQ-788 (1  $\mu$ M, antagonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>B</sub>) e totalmente abolido com a incubação das preparações de EOA com ambos os antagonistas. Tais achados permitem concluir que a ET-1, *in vitro*, não causa qualquer efeito contrátil em nenhum dos ductos do trato biliar extra-hepático, mas inibe as contrações induzidas pelo carbacol no EOA, mas não EOP. A síntese de prostanóides inibe um efeito contrátil direto da ET-1 na porção distal do ducto biliar comum e também bloqueia o efeito depressor, mediado por receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, da ET-1 sobre as contrações induzidas pelo carbacol no EOA de cobaia.

## SUMMARY

The effects of endothelin-1 (ET-1) on motility of different portions of the extra-hepatic biliary tract isolated from guinea pigs were studied. ET-1 (up to 100 nM) failed to contract rings of hepatic or cystic ducts, or of the proximal half of the common bile duct, which were all also unresponsive to cholecystokinin C-terminal octapeptide (CCK-8, up to 100 nM), histamine, carbachol (up to 100  $\mu$ M) or KCl 80 mM. Although carbachol and CCK-8 induced robust contractions of the distal half of the common biliary duct, ET-1 also failed to contract this portion. Indomethacin (5.6  $\mu$ M) did not change responsiveness of the distal common bile duct to CCK-8, but enhanced the potency of carbachol 500-fold and unmasked robust ET-1-induced contractions [mean  $EC_{50}$  7.8 nM (95% C.L. 5.5-11.1),  $E_{MAX}$   $80 \pm 6\%$  relative to KCl 80 mM]. ET-1, the selective  $ET_B$  receptor agonist sarafotoxin S6c and histamine all failed to contract ampullary (ASO) or papillary (PSO) portions of the sphincter of Oddi, whereas carbachol elicited tonic contractions and increases in frequency of phasic contractions of either preparation, and CCK-8 induced small transient contractions. Unlike CCK-8, ET-1 and sarafotoxin S6c, incubated 2 min beforehand, caused graded inhibitions of carbachol-induced contractions in ASO (but not PSO) rings. At 100 nM, ET-1 and sarafotoxin S6c inhibited responses to carbachol (1  $\mu$ M) by  $62.5 \pm 5\%$  and  $45 \pm 9\%$ , respectively. Indomethacin abolished ET-1-induced depression of carbachol-induced ASO contraction, but did not unmask contractile effects in ASO or PSO. The depressor effect of ET-1 in ASO was partially blocked by BQ-123 (1  $\mu$ M, a selective  $ET_A$  receptor antagonist), unchanged by BQ-788 (1  $\mu$ M, a selective

ET<sub>B</sub> receptor antagonist) and abrogated by co-incubation with both antagonists. Thus, *in vitro* ET-1 does not contract any ducts of the guinea pig extra-biliary tract, but inhibits carbachol-induced ASO (but not PSO) contractions. Prostanoid synthesis inhibition unveils clear contractile effects of ET-1 in distal common bile duct only, and also blocks the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor-mediated depressor effect of ET-1 on carbachol-induced ASO contraction.



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1. As Endotelinas.

Em um trabalho surpreendente publicado em 1988, YANAGISAWA *et al.* descreveram, de uma só vez, o isolamento, a caracterização estrutural, a via básica de biossíntese e as propriedades vasoconstritoras *in vitro* e *in vivo* de um novo peptídeo presente no sobrenadante da cultura de células endoteliais de aorta de porco. Os resultados apresentados apontavam o peptídeo, chamado endotelina, como o vasoconstritor mais potente conhecido até então. Além disso, seu efeito hipertensivo pronunciado e muito duradouro em ratos anestesiados e quimicamente simpatectomizados, levou os autores a sugerirem que a endotelina talvez integrasse um novo sistema de controle cardiovascular.

A descoberta prontamente estimulou um esforço intensivo da comunidade científica, na busca de melhor caracterização das propriedades biológicas e implicações fisiológicas e patofisiológicas da endotelina. Segundo a base de dados do Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>), desde a sua descoberta já foram publicados mais de 11.000 trabalhos em que a endotelina figura como palavra-chave, sendo que mais de 7.500 dos quais apresentam esta palavra-chave no título. As evidências acumuladas já asseguraram um papel importante deste peptídeo (e de suas isoformas - ver Figura 1) em múltiplos órgãos, tecidos e sistemas (para revisões ver MASAKI *et al.*, 1992; SAKURAI *et al.*, 1992; RAE, *et al.* 1995; POUSSET, 1998; WEBB, *et al.* 1998).

Constatando que haviam, pelo menos, 3 isoformas de endotelina, INOUE *et al.* (1989) renomearam aquela originalmente caracterizada por YANAGISAWA *et al.* (1988) de endotelina-1 (ET-1), para diferenciá-la das

demais, a endotelina-2 (ET-2) e a endotelina-3 (ET-3). Um quarto isopeptídeo, encontrado no intestino de camundongos e denominado “peptídeo intestinal vasoconstritor” (VIC) ou ET- $\beta$  (SAIDA *et al.*, 1989), acabou revelando-se como a variante da ET-2 encontrada em camundongos e ratos (BLOCH *et al.*, 1991). As ETs apresentam grande homologia estrutural entre si, bem como com as sarafotoxinas S6a, S6b, S6c e S6d, peptídeos isolados do veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (para revisão ver SOKOLOVSKY, 1992). Tanto as ETs como as sarafotoxinas caracterizam-se por possuir 21 resíduos de aminoácidos e duas pontes de dissulfeto unindo pares de resíduos de cisteína (Cis<sup>1</sup>-Cis<sup>15</sup> e Cis<sup>3</sup>-Cis<sup>11</sup>) e uma seqüência C-terminal conservada, necessária para suas atividades biológicas (para revisão ver SOKOLOVSKY, 1992; KOCHVA *et al.*, 1993). As estruturas das 3 isoformas de ETs, bem como da sarafotoxina S6c são ilustradas na **Figura 1**.

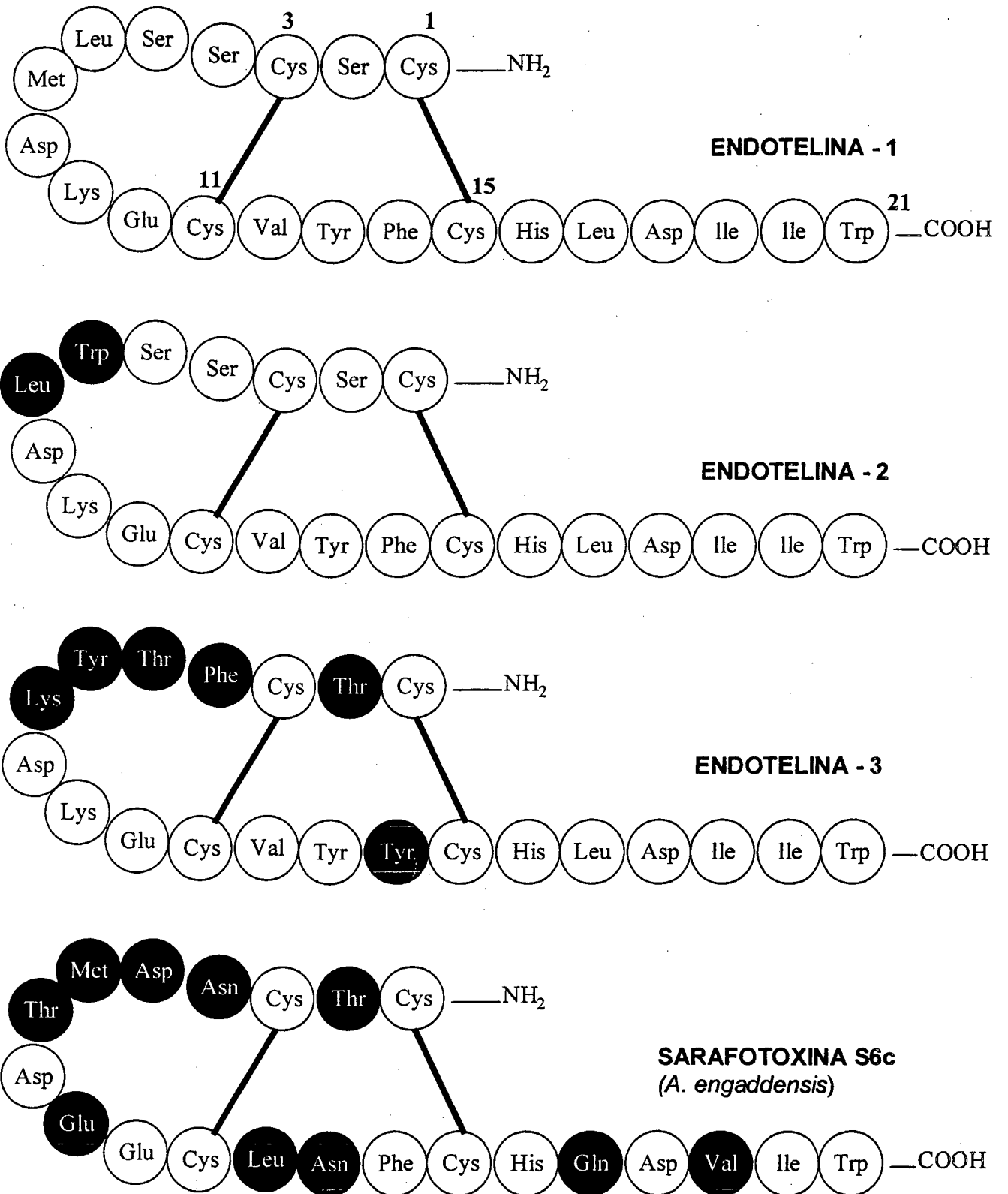


FIGURA 1 – Estruturas das endotelinas-1, -2, -3 e sarafotoxina S6c.

### 1.2. Biosíntese das Endotelinas -

O gene que codifica a ET-1 pode ser detectado em uma grande variedade de tecidos, sendo que a expressão de RNAm para ET-1 ocorre principalmente em células musculares lisas e endoteliais dos vasos sangüíneos, bem como em diferentes células (epiteliais, macrófagos e fibroblastos, entre outras) presentes no coração, pulmão, cérebro, rins, trato gastrintestinal, pâncreas e fígado. A expressão de ET-2 também ocorre principalmente no endotélio vascular, assim como no músculo liso do intestino delgado e grosso, miocárdio, estômago, rins, placenta e útero. Já a expressão de ET-3 se dá predominantemente no cérebro, mas é também encontrada no pulmão, trato gastrointestinal e rins. A ampla distribuição tecidual das ETs sugere que as mesmas possam participar, independentemente umas das outras, de complexos mecanismos reguladores de vários órgãos (para revisão ver MASAKI *et al.*, 1999; WEBB *et al.*, 1997).

A síntese de cada ET é codificada por um gene distinto, que comanda a formação de um precursor específico para cada isoforma madura, chamado de pré-pró-ET (INOUE *et al.*, 1989). Na extremidade 5' do gene codificador da pré-pró-ET-1, há sítios de ligação para os fatores de transcrição *AP-1* e *Jun*, que comandam a transcrição do mesmo (INOUE *et al.*, 1989) e explicam a rápida indução do RNAm para ET-1 após o tratamento de células endoteliais com éster de forbol (para revisão ver MIYAUCHI e MASAKI, 1999). Na região 3' do gene existe uma seqüência que regula seletivamente a desestabilização do RNAm da pre-pró-endotelina-1. Estes sítios servem como mecanismos potenciais para regulação da produção de ET a nível transcripcional e translacional. Vários fatores podem regular a síntese de ET-1, agindo no

promotor do gene de ET-1, pelo menos em células endoteliais cultivadas, tais como: hormônios vasoativos, mediadores inflamatórios e fatores físico-químicos como o estresse de cisalhamento e a hipóxia. Outros fatores, incluindo óxido nítrico, drogas doadoras de óxido nítrico, peptídeos natriuréticos e prostanóides dilatadores, inibem a síntese de ET-1 por promoverem produção de GMP cíclico ou AMP cíclico (GRAY e WEBB, 1996). Uma vez formada, a pré-pró-ET-1 (constituída por 212 amino-ácidos) é clivada em dois pontos (entre Lys<sup>51</sup>-Arg<sup>52</sup> e Arg<sup>91</sup>-Arg<sup>92</sup>) por uma endopeptidase específica para pares di-básicos, provavelmente a furina convertase (DENAULT *et al.*, 1995), originando um peptídeo intermediário de 38 amino-ácidos chamado big-ET-1 (ver **Figura 2**). Por sua vez, a big-ET-1 é então transformada no peptídeo ativo ET-1 por ação de uma enzima conversora de ET (ECE; para revisão ver BATTISTINI *et al.*, 1993). As evidências acumuladas até o momento sugerem que o processamento dos precursores da ET-2 e da ET-3 ocorram por mecanismos análogos àqueles envolvidos na gênese da ET-1 (para revisão ver TURNER, *et al.*, 1996).

Até o momento foram clonadas duas ECEs distintas, denominadas de ECE-1 (XU *et al.*, 1994; SHIMADA *et al.*, 1994) e ECE-2 (EMOTO e YANAGISAWA, 1995). Ambas são metalopeptidases sensíveis ao bloqueio pelo fosforamidom, mas não pelo tiorfano ou pelo captopril. A ECE-1 apresenta atividade ótima em pH neutro e parece funcionar tanto na via secretória quanto na superfície celular (para revisão ver TURNER *et al.*, 1998). A ECE-1 é codificada por um único gene, mas pode apresentar-se em pelo menos 4 isoformas distintas, dependendo de qual promotor é ativado para transcrição do mesmo: a ECE-1a (também conhecida por ECE-1 $\beta$ ), ECE-1b (também

conhecida por ECE-1 $\alpha$ ), ECE-1c e ECE-1d (SHIMADA *et al.*, 1994, 1995; VALDENNAIRE *et al.*, 1999). Embora as várias isoformas de ECE-1 apresentem estruturas muito semelhantes, diferenças nas porções próximas à amina terminal parecem ser importantes em definir a quais compartimentos celulares cada isoforma se destinará: ao complexo de Golgi ou à porção externa da membrana celular. Por sua vez, a ECE-2, que é codificada por um gene distinto da ECE-1, e é cerca de 250 vezes mais sensível ao bloqueio pelo fosforamidom do que as isoformas desta última, apresenta atividade ótima em pH ácido (5.5) e esta localizada na rede trans-Golgi. Parece haver pelo menos 2 isoformas de ECE-2 (ECE-2a e ECE-2b; NAKAHARA *et al.*, 1999).

Evidências funcionais e bioquímicas sugerem ainda a existência de ECEs distintas da ECE-1 ou ECE-2 (para revisão ver OPGENORTH *et al.*, 1995). Neste sentido, membranas pulmonares de rato contém uma ECE sensível ao bloqueio por pepstatina (CHIOU *et al.*, 1994), o ducto deferente de rato apresenta uma enzima sensível ao bloqueio por tiorfano que converte big-ET-3 (MATTERA *et al.*, 1993), a circulação pulmonar de cobaia parece conter uma ECE distinta que converte big-ET-1, mas não big-ET-2, enquanto a sistêmica converte ambas (GRATTON *et al.*, 1995). Finalmente, uma quimase produzida por mastócitos é capaz de converter a big-ET-1 em ET-1-(1-31), um novo membro da família das endotelinas endógenas (WYPIJ *et al.*, 1992; NAKANO *et al.*, 1997)

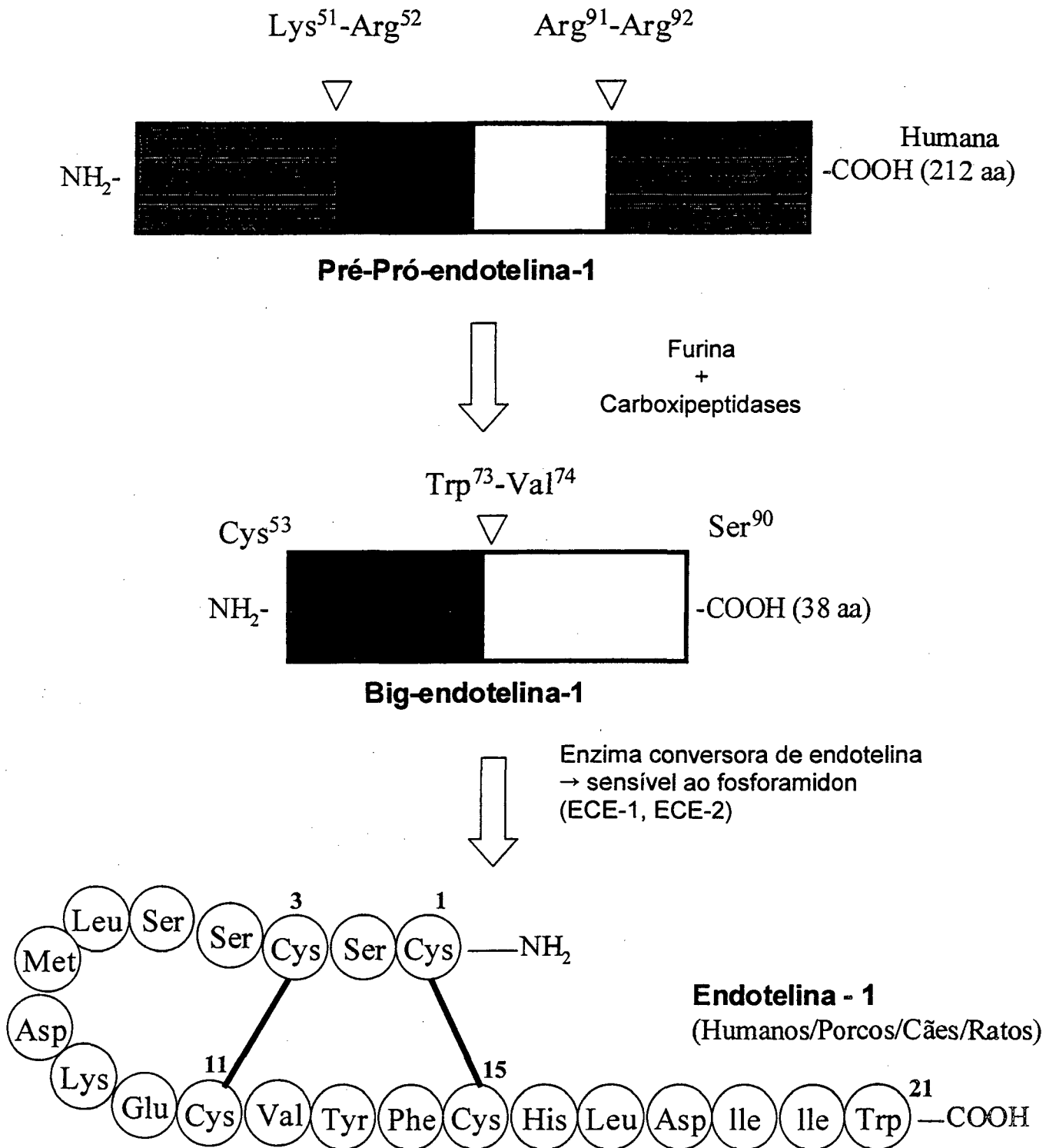


FIGURA 2 – Esquema da biossíntese da endotelina-1.

(aa – aminoácidos).

### 1.3. Receptores para Endotelinas -

Os diversos efeitos produzidos pelas ETs são mediados pela ativação de receptores endotelinérgicos específicos, que pertencem à superfamília de receptores com sete domínios transmembranares acoplados a proteínas G, mas apresentam diferenças importantes no que se refere a afinidade pelas várias isoformas de ETs (para revisão ver KOCHVA *et al.*, 1993; BAX e SAXENA, 1994). Estudos empregando técnicas de biologia molecular identificaram, até o presente, apenas dois receptores endotelinérgicos distintos em mamíferos: o receptor ET<sub>A</sub>, que apresenta maior afinidade pela ET-1 e ET-2 do que pela ET-3 (ARAI *et al.*, 1990), e o receptor ET<sub>B</sub>, que não discrimina entre as três ETs endógenas (SAKURAI *et al.*, 1990). Embora não se conheça agonistas seletivos do receptor ET<sub>A</sub>, há diversos antagonistas seletivos peptídicos e não-peptídicos desse receptor, tais como BQ-123, FR 139317, BQ-610 (todos peptídicos) e o A-127722 (não-peptídico), entre muitos. Por outro lado, há diversas substâncias capazes de interagir seletivamente com receptores ET<sub>B</sub>, seja como agonista (sarafotoxina S6c, IRL-1620 e BQ-3020, entre outros) ou como antagonista (o peptídeo BQ-788 e o IRL 2500 drogas não-peptídicas como o Ro 47-0203 e o A-192621 sulfonamida (para revisão ver MASAKI *et al.*, 1994; WEBB *et al.*, 1997).

Os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> humanos já clonados exibem 60% de homologia estrutural. O RNAm que expressa o receptor ET<sub>A</sub> pode ser detectado em diversos tecidos ou órgãos, entre os quais a aorta, coração e rins, e se localiza predominantemente nas células musculares lisas vasculares sendo responsável pelo efeito vasoconstritor dos vasos sanguíneos (DAVENPORT *et al.*, 1994). No entanto, este RNAm não foi detectado no



figado ou em células endoteliais (HOSODA *et al.*, 1991). O receptor ET<sub>B</sub> pode ser detectado em células endoteliais e no músculo liso vascular, e é predominantemente encontrado no cérebro, pulmão, rins e aorta (OGAWA *et al.*, 1991).

Um terceiro tipo de receptor endotelinérgico, que apresenta maior afinidade pela ET-3 do que pela ET-1 ou ET-2, foi clonado do genoma de *Xenopus laevis* e chamado de ET<sub>C</sub> (KARNE *et al.*, 1993). Por enquanto, as evidências para a ocorrência desse tipo de receptor em mamíferos são apenas funcionais (EMORI *et al.*, 1990). Além disso, há muitos relatos de efeitos das ETs mediados por ativação de receptores endotelinérgicos que não apresentam uma ou mais características básicas de quaisquer dos 2 tipos ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (para revisão ver BAX e SAXENA, 1994).

#### **1.4. Mecanismos Celulares Acoplados a Receptores para Endotelinas -**

As endotelinas estão envolvidas em diversos processos biológicos, tais como contração de vários tecidos, incluindo músculo liso vascular, neuromodulação, proliferação celular e em certas condições patofisiológicas como deficiências renais e cardíacas, os quais podem ser atribuídas a existência de vários subtipos de receptores ou a ativação mediada pela proteína G de diferentes vias de transdução, ou a ação combinada destes dois mecanismos (SOKOLOVSKY, 1995). Ambos os receptores endotelinérgicos, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, podem acoplar-se, através de proteínas G a múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo aquelas que envolvem a ativação das fosfolipases A<sub>2</sub>, C ou D, da adenilato ciclase (AC), da guanilatociclase solúvel, da bomba antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (SIMONSON *et al.*, 1989; AMBAR e

SOKOLOVSKY, 1993) e indiretamente via liberação de outras substâncias bioativas.

A vasoconstrição mediada pelos receptores do tipo  $ET_A$  ou  $ET_B$ , por exemplo, envolve a ativação da fosfolipase C, a qual causa hidrólise de fosfatidilinosítóis com a formação rápida de 1, 4, 5- inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e acumulação de 1,2-diacilglicerol (DG). A elevação dos níveis citosólicos de inositol trifosfato induz a liberação de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) dos depósitos intracelular sarcoplasmático (RESINK *et al.*, 1988), o que gera um aumento transiente da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ . No entanto, esse aumento é seguido de um acréscimo sustentado da concentração do íon, resultante do influxo de  $Ca^{2+}$  externo (SIMONSON *et al.*, 1990), induzido pela ativação de canais de cálcio do tipo-L dependentes de voltagem e/ou canais de cátion não-seletivos operados por receptor (para revisão ver MIYAUCHI e MASAKI, 1999; GOTO *et al.*, 1996; SOKOLOVSKY, 1992; entre outros). Além disso, o aumento na concentração de cálcio intracelular induzido pela ativação do receptor endotelinérgico pode causar ativação da fosfolipase  $A_2$  e D, e mudanças no metabolismo do ácido araquidônico (MIYAUCHI e MASAKI, 1999).

Por outro lado, a elevação dos níveis de diacilglicerol ativa a proteína quinase C com consequente fosforilação protéica (SUNAKO *et al.*, 1990). Tem sido sugerido que a formação do diacilglicerol pode ser mediada, alternativamente, através da ativação da fosfolipase D, que induz a formação do ácido fosfatídico, a partir da fosfatidilcolina, para conversão em diacilglicerol (AMBAR e SOKOLOVSKY, 1993). A ativação da fosfolipase D pelas ETs pode

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

A ET-1 também pode ativar a fosfolipase A<sub>2</sub>, promovendo a formação de ácido araquidônico com conseqüente geração de eicosanóides. A infusão de ET-1 induz a liberação de prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub> no pulmão perfundido de rato e cobaia (DE NUCCI *et al.*, 1988; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1992). No baço e rim de coelho, a inibição da síntese de eicosanóides pela via da ciclooxigenase potencializa os efeitos vasoconstritores da ET-1 (RAE *et al.*, 1989). GRASSI-KASSISSE *et al.* (1994) verificaram que os prostanóides endógenos também modulam a vasoconstrição induzida pela ET-1 no baço perfundido de cão. Possivelmente, a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> é mediada pela estimulação da proteína G em função da ativação do receptor para ET (REYNOLDS *et al.*, 1989). No entanto, sugere-se ainda que a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> seja uma conseqüência do aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> induzido pela fosfolipase C (para revisão ver SOKOLOVSKY, 1992).

As ETs podem ainda estimular a bomba antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que promove alcalinização celular, com conseqüente aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e sensibilização das enzimas dependentes de Ca<sup>2+</sup> ao cátion (VIGNE *et al.*, 1991).

O efeito vasodilatador das ETs pode resultar da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> e conseqüente formação de prostaglandinas (I<sub>2</sub> e/ou E<sub>2</sub>), mencionado anteriormente, bem como na formação de óxido nítrico pelo endotélio vascular (DE NUCCI *et al.*, 1988), e conseqüente ativação de uma guanilato ciclase solúvel presente em células musculares lisas (IGNARRO, 1989). As ETs podem também inibir ou estimular a formação de AMPc em vários tecidos. Em

células endoteliais de capilares cerebrais, por exemplo, as ETs inibem a formação de AMPc via ativação do receptor ET<sub>A</sub> (LADOUX e FRELIN, 1991), mas em miócitos cardíacos de ratos adultos, a ET-1 reduz a formação de AMPc em resposta à isoproterenol e forskolin (HILAL-DANDAN *et al.*, 1992). O acúmulo de AMPc pode ser devido a estimulação da AC seja por ativação da fosfolipase C (FELDER *et al.*, 1989) ou da fosfolipase A<sub>2</sub> e síntese de PGE<sub>2</sub>, que então estimula a AC (para revisão ver SOKOLOVSKY, 1995). Além disso, as ETs estimulam a produção de GMPc via formação de óxido nítrico através da ativação de receptores endotelinérgicos acoplados à proteína G sensíveis a toxina Pertussis (para revisão ver SOKOLOVSKY, 1995).

A ET-1 pode também interagir com canais de potássio sensíveis ao ATP, desta forma contribuindo para o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (GRAY e WEBB, 1996). Como podemos constatar, os mecanismos de ação das ETs são bastante complexos, podendo envolver a ativação de diferentes enzimas e canais iônicos, bem como a liberação de vários mediadores químicos.

### 1.5. Endotelinas no trato Gastrointestinal -

As ETs, assim como os seus receptores, estão amplamente distribuídos por todo o organismo, e são produzidos por diversos tecidos, inclusive naqueles que integram o trato gastrointestinal. Em ratos, a ET-1 e/ou seu RNAm estão presentes em quantidades significativas no estômago, intestino delgado, cólon, baço e fígado (TAKAHASHI *et al.*, 1990). Níveis apreciáveis de ET-3 também ocorrem no intestino delgado dessa espécie, mas outros tecidos/órgãos do trato apresentam quantidades bem menores do peptídeo (MATSUMOTO *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1990). Na espécie humana,

quantidades significativas de ET-1 são produzidas no cólon e pelo epitélio biliar (INAGAKI *et al.*, 1991; HOUSSET *et al.*, 1993), mas ainda não se sabe se essa e as demais ETs estão presentes em outras partes do trato. No cólon humano, a ET-1 apresenta-se concentrada principalmente nos plexos nervosos mioentéricos e submucosos (INAGAKI *et al.*, 1991).

Experimentos conduzidos com diversos tecidos isolados do trato gastrointestinal têm demonstrado efeitos variados das ETs na motricidade (para revisão ver RAE *et al.*, 1995). Nesse sentido, a ET-1 causa contrações do esôfago (EGLEN *et al.*, 1989), fundo de estômago (DE NUCCI *et al.*, 1988; WARNER *et al.*, 1993; FULGINITTI *et al.*, 1993), cólon de rato (LEMBECK *et al.*, 1989; MOUMMI *et al.*, 1992a) e da vesícula biliar de cobaia (MOUMMI *et al.*, 1992; BATTISTINI *et al.*, 1994; CARDOZO *et al.*, 1997). Por outro lado, o peptídeo inicialmente relaxa e depois contrai o jejuno de coelho (LEMBECK *et al.*, 1989) e o íleo de cobaia (GUIMARÃES e RAE, 1992), mas apenas relaxa a *taenia coli* de cobaia além de inibir a atividade espontânea dessa preparação (WIKLUND *et al.*, 1989; USUNE *et al.*, 1991).

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

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

Por outro lado, há evidências de que as ETs possam estar implicadas em algumas fisiopatologias, como úlcera gástrica, colite ulcerativa e doença de Crohn. Além disso, como as ETs afetam mecanismos secretórios intestinais, é possível que elas participem na gênese de quadros diarrêicos, embora ainda não existam evidências objetivas nesse sentido.

Finalmente, outro componente importante do trato gastrointestinal é o trato biliar. No entanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos das ETs nas várias estruturas que compreendem o trato biliar, e por estas estruturas constituírem o objeto de nosso estudo, faz-se necessário mencionarmos com mais detalhes a anatomia, fisiologia e farmacologia do trato biliar.

### **1.6. O Trato Biliar -**

O trato biliar, que desempenha um papel essencial na produção de bile e sua descarga para o duodeno, é formado por uma parte intra-hepática e outra extra-hepática. A parte intra-hepática do trato biliar consiste de canalículos biliares, dúctulos biliares (ou canais de Hering), ductos (ou septos) interlobulares e ductos biliares terminais (SHERLOCK, 1987). Os canalículos biliares são espaços tubulares que coletam a bile secretada pelos hepatócitos que os circundam. Dos canalículos, a bile flui periféricamente e

consecutivamente para os ductos interlobulares, aos ductos (os quais se encontram na zona portal do fígado), que, por fim, se esvaziam nos ductos biliares terminais que desembocam coletivamente no ducto hepático, que já integra a parte extra-hepática do trato biliar. Os ductos e ductos biliares são revestidos por células epiteliais especializadas chamadas colangiócitos (para revisão ver STRAZZABOSCO *et al.*, 2000). A parte extra-hepática do trato biliar é formada pela vesícula biliar e três ductos biliares distintos. O ducto comum hepático, que emerge do fígado e une-se ao ducto cístico para formar o ducto biliar comum. O ducto biliar comum, que juntamente com o ducto pancreático, forma a junção colédoco-duodenal também denominado de esfíncter de Oddi. Todos os ductos, que constituem a parte extra-hepática do trato biliar, bem como a vesícula biliar, são revestidos intraluminalmente por células epiteliais. A parte sub-epitelial dos ductos consiste predominantemente de tecido conectivo e poucas células musculares lisas (PFAFFENDORF *et al.*, 1991). Apesar disto, os ductos são capazes de contrair e deste modo ocorre um aumento da pressão intraluminal (JACOBSSON, 1957; YAMASATO e NAKAYAMA, 1988). Já a vesícula biliar é formada por uma mucosa constituída por epitélio prismático simples, lâmina própria, músculo liso, tecido conjuntivo perimuscular e serosa, enquanto o esfíncter de Oddi é um pequeno complexo de musculatura lisa que circunda o ducto biliar comum terminal, ducto pancreático, e o canal comum (também chamado de Ampula de Vater, quando presente). As partes do trato biliar que participam ativamente no controle do fluxo de bile são a vesícula biliar e o esfíncter de Oddi (para revisão, ver LONOVICS *et al.*, 1998).

Todas as células hepáticas secretam continuamente pequena quantidade de bile, que é composta de água (85 a 95%), colesterol, sais biliares, fosfolípidos (entre eles, lecitinas lisolecitinas e fosfatidiletanolamina), pigmentos (bilirrubina), proteínas, eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloreto, carbonatos) e uma variedade de produtos de degradação química (para revisão ver BURWEN *et al.*, 1992). Suas principais funções fisiológicas parecem ser a de auxiliar na dissolução das gorduras provenientes da dieta e de constituir uma via importante de eliminação de substâncias tóxicas exógenas ou provenientes do metabolismo. A formação da bile requer a função coordenada de dois tipos de células epiteliais: hepatócitos, que são responsáveis pela secreção dos principais constituintes biliares e os colangiócitos, que regulam a fluidez e alcalinidade da bile através da secreção de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  (STRAZZABOSCO, 1997).

A secreção de bile é relativamente independente da pressão de perfusão e a bile é formada por diferentes processos de transporte dependentes de energia (BLITZER e BOYER, 1982; ERLINGER, 1981), principalmente pelo gradiente de sódio gerado pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase presente na superfície basolateral do hepatócito. Há uma excelente correlação entre o fluxo de bile e a secreção de sais biliares, que estão presentes na bile como micelas, e que regulam, por força osmótica, o acúmulo de água (SHERLOCK, 1994).

A bile hepática é estocada na vesícula biliar, onde a concentração de sais biliares, bilirrubina e colesterol pode aumentar em até 10 vezes ou mais, pois estes constituintes não permeiam a mucosa vesicular, que no entanto pode reabsorver e/ou secretar água e eletrólitos permeantes. O transporte



através do epitélio da vesícula biliar é influenciado por peptídeos gastrointestinais, prostaglandinas, ácidos biliares e o sistema nervoso autônomo (WOOD e SVANVIK, 1983).

Em circunstâncias fisiológicas, a vesícula biliar (VB) armazena e concentra a bile proveniente das células hepáticas durante o período de jejum, até que se torne necessária no duodeno, sendo que, em humanos, a secreção total diária de bile está em torno de 600 a 1000 ml. O armazenamento vesicular de bile é presumivelmente suportado pelas funções fisiológicas do esfíncter de Oddi. A motilidade da VB é controlada por mecanismos neurais e hormonais envolvendo inervação autonômica colinérgica, adrenérgica (CAI e GABELLA, 1983) e não-adrenérgica/não-colinérgica (NANC) (DAVISON et al., 1978). A inervação simpática origina-se dos segmentos T7 a T10 e seguem até o plexo celíaco e gânglio esplâncnico (ADKINS et al., 2000). A colecistocinina (CCK) é considerada o principal fator endócrino a controlar as contrações da VB no período pós-prandial, em parte por um efeito direto do peptídeo nas células musculares lisas da VB, bem como, por outro lado, por ativação de mecanismos neurais colinérgicos pré-ganglionares vagais (RYAN, 1987; IVY e OLDBERG, 1928; WIENER *et al*, 1981). A motilidade vesicular também é regulada direta ou indiretamente por vários outros hormônios ou neuropeptídeos, incluindo VIP, NO, somatostatina, substância P, polipeptídeo pancreático, CGRP e secretina, liberados de diferentes fontes (RYAN, 1987; LIN *et al*, 1975 ; LONOVICS, 1991). Portanto, a VB não é simplesmente um reservatório para armazenamento contínuo e passivo de bile durante o período de jejum (RYAN, 1987).

Já o esfíncter de Oddi, cuja função essencial é regular o fluxo de bile e suco pancreático e prevenir o refluxo do duodeno para o ducto, difere de espécie para espécie tanto em sua anatomia quanto em suas ações fisiológicas (TOOULI *et al.*, 1991). Por exemplo, em humanos, gatos e cães, o esfíncter é intraduodenal, curto e age como um resistor. Nestas espécies, o fluxo pós-prandial de bile é promovido por relaxamento do tônus basal e supressão da contração fásica. Por outro lado, em animais como cobaia, gambá e coelho, o esfíncter é longo, parcialmente extraduodenal e age como uma bomba peristáltica, disponibilizando bile ativamente para o duodeno (RYAN *et al.*, 1987; TOOULI *et al.*, 1983). Por conseguinte, o processo regulatório do esfíncter de Oddi também varia dependendo da espécie. Muitos peptídeos, incluindo gastrina, secretina, glucagon, bombesina, metionina-encefalina e somatostatina, são capazes de influenciar a atividade do esfíncter de Oddi *in vivo*, mas não *in vitro*, o que sugere que ajam indiretamente sobre o esfíncter de Oddi (LONOVICS *et al.*, 1990; VARRÓ *et al.*, 1988; LONOVICS e VELÖSY, 1990; DAHLSTRAND *et al.*, 1986). Porém, um grupo seletivo de peptídeos, que inclui a SP, o VIP e a CCK são ativos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

A exemplo da VB, a atividade motora do esfíncter de Oddi também está sob controle neural e hormonal (LEHMAN e SHERMAN, 1996), sendo ricamente innervado por neurônios colinérgicos, adrenérgicos e NANC (para revisão ver TOOULI *et al.*, 1991; LONOVICS *et al.*, 1998). Enquanto a innervação colinérgica parassimpática parece ter uma influência motora excitatória, por ativação de colinoceptores muscarínicos (HIROSE e ITO, 1991), a noradrenérgica simpática pode exercer influência excitatória ou

inibitória, mediada por adrenoceptores  $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$  e  $\beta_2$ , respectivamente (WELLS e MAWE, 1994). A inervação NANC do esfíncter de Oddi apresenta, claramente, pelo menos duas divisões: 1) uma excitatória taquicinérgica, que em alguns neurônios parece co-existir com um componente colinérgico (TALMAGE *et al.*, 1997); e 2) uma inibitória composta por neurônios que liberam VIP e/ou NO (PADBURY *et al.*, 1993; WELLS *et al.*, 1995). O controle neural da motilidade do esfíncter de Oddi parece depender não só da inervação autonômica, como também de circuitos neurais intra-biliares (THUNE *et al.*, 1991; MULLER *et al.*, 1984) e de neurônios sensoriais duodenais (KENNEDY *et al.*, 1998).

### 1.6.1. Endotelinas no Trato Biliar.

A ET-1 parece ser produzida por células epiteliais de VB, uma vez que HOUSSET *et al.* (1993) observaram que células epiteliais cultivadas da VB e do trato biliar intra- e extra-hepático humanos expressam RNAm para ET-1 e secretam esse peptídeo. Além disso, alguns autores demonstram níveis aumentados de ETs em pacientes com síndromes hepatorenais, entre elas, cirrose e colangites. (ASBERT *et al.*, 1993; PINZANI *et al.*, 1996). A ET-1 também induz colestase em ratos (ISALES *et al.*, 1993) e aumenta a frequência de contração dos canalículos biliares formados entre hepatócitos cultivados de rato (KAMIMURA *et al.*, 1993).

A maior parte dos trabalhos publicados acerca das ETs no trato biliar concentram-se na VB. MOUMMI *et al.* (1992) verificaram que a ET-1 é quase tão potente quanto o octapeptídeo C-terminal da colecistocinina (CCK-8) em contrair tiras de VB isoladas de cobaia. Além disso, CARDOZO *et al.* (1997)

verificaram que a ET-1 é equipotente à CCK-8 em causar contração desta preparação e que sua ação depende da síntese de eicosanóides e do influxo de  $Ca^{2+}$  (em parte através dos canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem do tipo L) via ativação de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ . Resultados semelhantes foram obtidos por BATTISTINI *et al.* (1994) no qual os autores sugerem a existência de uma população atípica de receptores endotelinérgicos na VB de cobaia. Por outro lado, a big-ET-1 e a big-ET-2, precursores imediatos da ET-1 e da ET-2, respectivamente, competem muito fracamente com a ET-1 marcada por sítios específicos em membranas celulares obtidas de VB de cobaia (BATTISTINI *et al.*, 1995), o que sugere que os efeitos contráteis dos precursores não são mediados através de uma ação direta sobre os receptores de ETs, mas dependem da sua conversão nos seus respectivos metabólitos ativos pela ECE presente no tecido. Além disso a vesícula biliar de cobaia parece apresentar uma ECE-1 que converte big-ET-1 e big-ET-2 exógenas, mas não big-ET-3 (CARDOZO *et al.*, 1997; BATTISTINI *et al.*, 1995). Estudos recentes indicam ainda que a ET-1, sintetizada pelo epitélio de VB humana, inibe a secreção aniônica dependente de AMPc via receptores acoplados a proteínas  $G_i$  (FOUASSIER *et al.*, 1998). Tais achados sugerem que a ET-1 exerça um possível papel fisiológico na concentração e composição da bile por mecanismos autócrinos e/ou parácrinos.

Por outro lado, até o presente não há qualquer estudo acerca das possíveis ações das ETs na motilidade dos demais tecidos que compõem o trato biliar extra-hepático, quais sejam os ductos hepático, cístico e biliar comum e o esfíncter de Oddi. Considerando que o epitélio destes tecidos

podem sintetizar ET-1, pareceu-nos pertinente investigar se o peptídeo é capaz de influenciar a motiidade destas porções do trato biliar extra-hepático.

## **2 – OBJETIVOS**

O presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

1. Avaliar os efeitos da ET-1 sobre a motilidade de diferentes porções do trato biliar extra-hepático isolados de cobaia, incluindo os ductos hepático, cístico e biliar comum, bem como o esfíncter de Oddi;
2. Caracterizar a possível participação de prostanóides nestas ações da ET-1;
3. Identificar os receptores endotelinérgicos que medeiam os efeitos da ET-1 no esfíncter de Oddi isolado de cobaia.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 – Animais**

Os experimentos foram realizados com cobaias (*Cavus porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300 a 400 g, criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, no Centro de Ciências Biológicas da instituição. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (6 a 10 por gaiola, 55 x 95 cm) em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes ligadas às 6:00 h). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

#### **3.2 – Montagem das preparações**

##### *3.2.1 – Ductos hepático, cístico e biliar comum isolados de cobaia*

As cobaias foram sacrificadas por pancada na nuca e deslocamento cervical. Após a laparotomia, o trato biliar extra-hepático, compreendendo o ducto hepático, o ducto cístico e o biliar comum, foi cuidadosamente dissecado, removido e transferido para placa de Petri contendo solução fisiológica de Krebs-Henseleit (ver composição abaixo). O ducto biliar comum foi seccionado ao meio originando 2 anéis semelhantes de cerca de 25 mm de comprimento (cada qual pesando em torno de 8 mg) denominados doravante de ducto biliar comum proximal (DBC-P, adjacente aos ductos hepático e cístico) e ducto biliar comum distal (DBC-D, adjacente ao esfíncter de Oddi). Anéis de ducto hepático e de ducto cístico (cerca de 40-50 mm de comprimento e 9 mg de peso) foram utilizados por inteiro (Figura 3A). Cada preparação foi então transferida para cubas de vidro contendo 5 ml de solução

de Krebs-Henseleit (composição mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; NaHCO<sub>3</sub> 25 e glicose 11 – pH 7.2-7.4) aquecida a 37°C e borbulhada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, onde foi suspensa entre duas hastes metálicas (uma das quais conectada a um transdutor isométrico) e submetida a uma tensão inicial de 0,5 g. As contrações isométricas foram registradas por miógrafos (F-60 myograph microdisplacement transducer, Narco Biosystems, USA) acoplados a um polígrafo de mesa (DMP-4B, Narco Biosystems, USA).

Após um período de estabilização de no mínimo 1 h, durante o qual a solução nutriente foi renovada a cada 15 min, todas as preparações foram expostas a uma solução de Krebs-Henseleit contendo 80 mM de KCl (por substituição equimolar de NaCl por KCl; doravante chamada de KCl 80 mM) como estímulo padrão. Uma vez estabilizada a resposta contrátil ao KCl 80 mM, o que geralmente ocorria dentro de aproximadamente 3 min, cada preparação foi lavada diversas vezes com solução normal de Krebs-Henseleit e re-equilibrada por mais 30 min antes de qualquer intervenção experimental. Todas as respostas contráteis subsequentes da preparação foram calculadas considerando a resposta obtida ao KCl 80 mM como 100%.



### 3.2.2 – *Esfíncter de Oddi isolado de cobaia.*

Cobaias foram sacrificadas com um golpe na cabeça e deslocamento cervical. Após a laparotomia, a junção colédoco-duodenal foi retirada e colocada numa placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit morna para remoção do tecido duodenal que circunda o esfíncter de Oddi e divisão em 2 anéis semelhantes de cerca de 20 mm de comprimento e 15 mg de peso, denominados de porção ampular (EOA, porção próxima ao DBC) e porção papilar (EOP, porção próxima ao duodeno) (Figura 3B). Em seguida, cada preparação foi transferida para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, nas mesmas condições para registro de contrações isométricas descritas anteriormente, sendo distendida a uma tensão basal de 0,3 g. Também conforme foi descrito anteriormente, cada preparação foi exposta ao KCl 80 mM 1 h após a montagem, para estabelecer-se a resposta padrão de 100%, sendo depois re-equilibrada por 30 min em solução de Krebs-Henseleit normal antes de qualquer nova intervenção experimental.

### 3.3 – Procedimentos experimentais

#### 3.3.1 – *Ducto cístico e Ducto hepático*

As preparações foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de ET-1 (0,1 a 100 nM), histamina, octapeptídeo C-terminal da colecistocinina sulfatada (26-33) (CCK-8) (0,1 a 100 nM) ou carbacol (10 nM a 300  $\mu$ M).

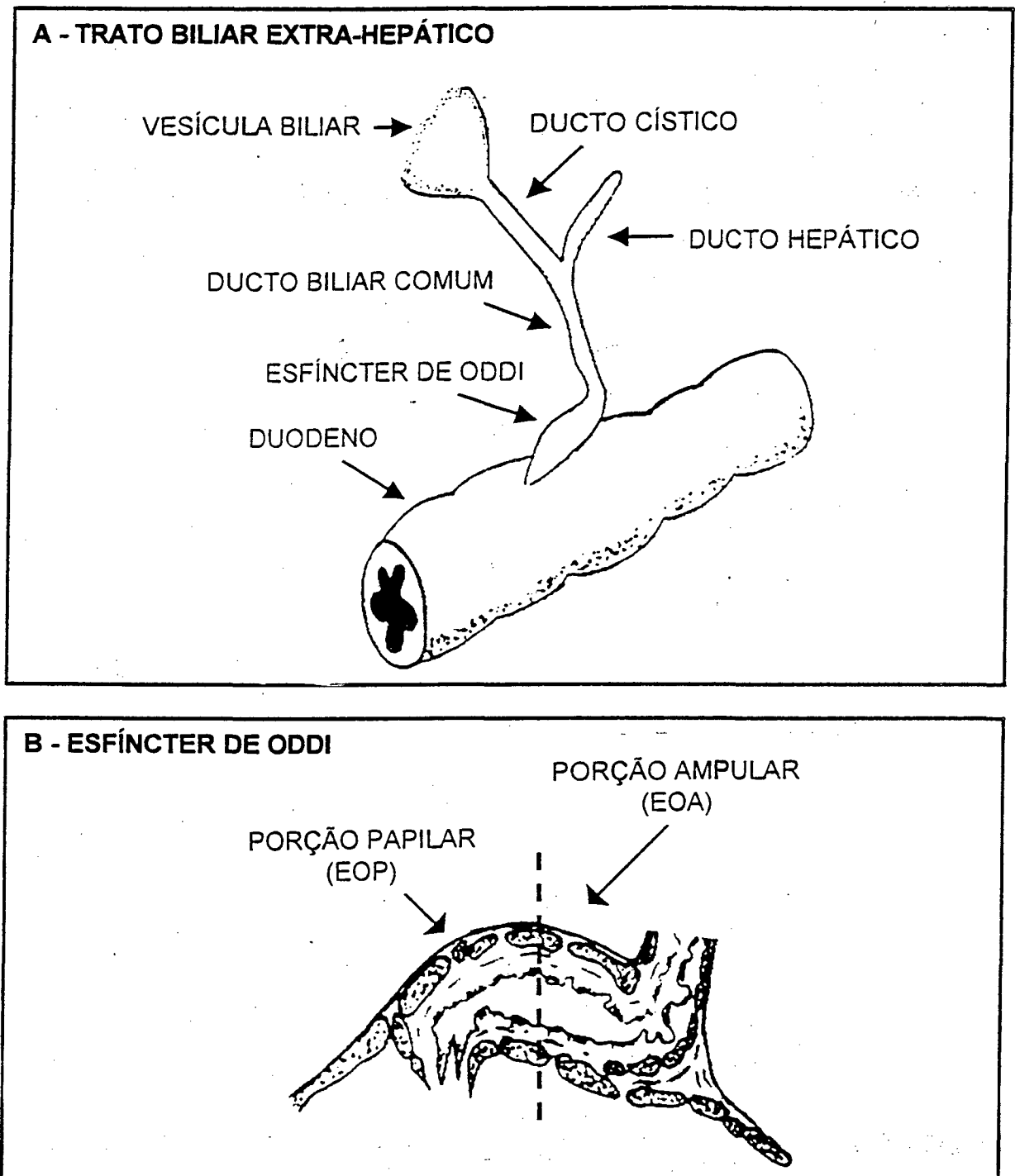


FIGURA 3 – Ilustração esquemática do trato biliar extra-hepático (A) e esfíncter de Oddi (B) na cobaia (modificado de Hirose *et al.*, 1991 e Patacchini *et al.*, 1997).

### 3.3.2 – *Ducto biliar comum (DBC)*

Decorrido o tempo de estabilização necessário para o retorno da tensão ao nível basal, as preparações de DBC-P e DBC-D foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de ET-1 (0,1 a 100 nM), histamina ou carbacol (10 nM a 300  $\mu$ M). Além disso, foram também obtidas curvas concentração-efeito para CCK-8 (0,1 a 100 nM) pelo método das doses isoladas, adicionadas cada qual por 1 min a intervalos de 10 min. Após cada adição de CCK-8 a solução foi imediatamente renovada 3 vezes.

Também foram realizados experimentos para avaliar a influência dos produtos da via da ciclooxigenase (prostanóides) nas respostas induzidas pela ET-1, carbacol ou CCK-8 no ducto biliar comum. Nesses experimentos, o bloqueador não-seletivo das ciclooxigenases indometacina (5,6  $\mu$ M) foi adicionado à cuba 30 min antes da obtenção de uma curva à ET-1, carbacol ou CCK-8.

### 3.3.3 – *Esfíncter de Oddi*

Para analisar a reatividade do EOA e EOP aos diferentes agonistas, os experimentos foram realizados em duas séries. Na primeira série, as preparações foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de ET-1, sarafotoxina S6c (0,1 a 100 nM), CCK-8 (0,1 a 100 nM), histamina ou carbacol (10 nM a 100  $\mu$ M) na presença ou ausência de indometacina (5,6  $\mu$ M). Em algumas preparações, foi testada a influência da indometacina sobre a curva concentração-efeito ao carbacol obtida pelo método das doses isoladas. Em todos estes experimentos, apenas uma curva concentração-efeito foi obtida em cada preparação.

Em outra série de experimentos, testamos a influência da ET-1, da sarafotoxina S6c e da CCK-8 sobre contrações submáximas induzidas por uma única concentração de carbacol (1  $\mu$ M e 3  $\mu$ M, para EOA e EOP, respectivamente). Nestes experimentos, as preparações foram expostas ao carbacol por 2-3 min a intervalos de 30 min, o que resultou em contrações reproduzíveis de magnitude semelhante à resposta induzida por 80 mM de KCl. Vinte e oito min após a primeira exposição ao carbacol (controle), uma concentração isolada de ET-1, sarafotoxina S6c (10, 30 ou 100 nM) ou CCK-8 (100 nM) foi adicionada à cuba por um período de 2 min e uma segunda resposta ao carbacol foi obtida na presença do agonista. Também foi avaliada a influência da indometacina na modulação das respostas do EOA e EOP ao carbacol pela ET-1 (100 nM). Nestes experimentos a indometacina foi adicionada à cuba 30 min antes da segunda exposição ao carbacol.

Com o objetivo de identificar os receptores envolvidos nos efeitos modulatórios induzidos pela ET-1 ou pela sarafotoxina S6c nas respostas contráteis do EOA ao carbacol, uma última série de experimentos avaliou as influências de antagonistas desses receptores. Nesses experimentos, testou-se a influência da incubação com o BQ-123 (1  $\mu$ M, um antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub>) e/ou o BQ-788 (1  $\mu$ M, um antagonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub>). Os antagonistas foram adicionados à cuba 8 min antes da adição da ET-1 ou da sarafotoxina S6c (i.e. 10 min antes da obtenção da segunda resposta ao carbacol).

### 3.4 – Apresentação dos resultados e análise estatística

As contrações induzidas pelos agonistas em todas as preparações são apresentadas como porcentagens da resposta ao KCl 80 mM. Por outro lado, os efeitos depressores da ET-1 e da sarafotoxina S6c sobre as contrações induzidas pelo carbacol em anéis de EOA ou EOP são apresentados como porcentagens de inibição da resposta ao carbacol. Os resultados de todos os experimentos são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) do número de experimentos indicados. Os efeitos máximos dos diversos agonistas estão simbolizados por  $E_{MAX}$ . Os valores das concentrações efetivas 50% ( $CE_{50}$ ; i.e. a concentração de agonista necessária para causar a metade do  $E_{MAX}$  do próprio agonista, em experimentos individuais) são apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança para 95% (FLEMING *et al.*, 1972).

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

### 3.5 – Drogas, sais e soluções

A ET-1 e a sarafotoxina S6c foram adquiridas da American peptide Company (Sunnyvale, EUA). O fragmento 26-33 amida sulfatado [Tyr(SO<sub>3</sub>H)<sup>27</sup>]-colecistocinina (CCK-8), o cloridrato de carbacol e o difosfato de histamina foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). O BQ-

123 [ciclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu)] foi sintetizado e cedido pelo Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Sherbrooke, Canadá. O BQ-788 (N-cis-2,6-dimetil-piperidinocarbonil-L-gamametileucil-D-1metóxicarboniltriptofanil-D-norieucina) foi adquirido da RBI (Natick, EUA).

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada e com sais de pureza analítica (Merck A. G., Rio de Janeiro – Brasil ou Darmstadt – Alemanha). A maioria das soluções estoque foram preparadas com tampão fosfato com exceção do cloridrato de carbacol que foi preparado em água bidestilada. As drogas foram armazenadas na forma de soluções estoque (10  $\mu$ M a 1 mM), mantidas em tubos siliconizados à -18°C, e diluídas até a concentração desejada imediatamente antes de serem utilizadas.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Ações induzidas pela endotelina-1 e outros agonistas nos ductos biliares extra-hepáticos isolados de cobaia.

Os anéis de ducto cístico e de ducto hepático isolados de cobaia não responderam a nenhum dos agonistas testados, quais sejam a ET-1, a CCK-8 (0,1 a 100 nM), a histamina, o carbacol (10 nM – 100  $\mu$ M) ou ao KCl 80 mM (resultados não apresentados, n=6).

Por outro lado, como a reatividade das porções distais e proximal do DBC diferiram entre si em resposta ao KCl 80 mM, estudou-se separadamente cada uma dessas porções. Aproximadamente 80 % das porções distais do DBC (DBC-D) apresentaram contrações rítmicas espontâneas que se iniciavam após os primeiros 30 min de equilíbrio e permaneciam até o término dos experimentos. Além disso, estas porções, quando expostas a 80 mM de KCl, responderam com contração sustentada média de  $4.23 \pm 0.4$  g de tensão por 10 mg de tecido úmido (n = 35), que estabilizou dentro de aproximadamente 10 min. Já a porção proximal do DBC (DBC-P), não exibiu resposta contrátil ao KCl 80 mM, embora tenha apresentado contrações rítmicas espontâneas (resultados não apresentados, n = 12). De modo semelhante, essas preparações não exibiram respostas contráteis à ET-1, carbacol, CCK-8 ou histamina (resultados não apresentados, n = 3 para cada agonista).

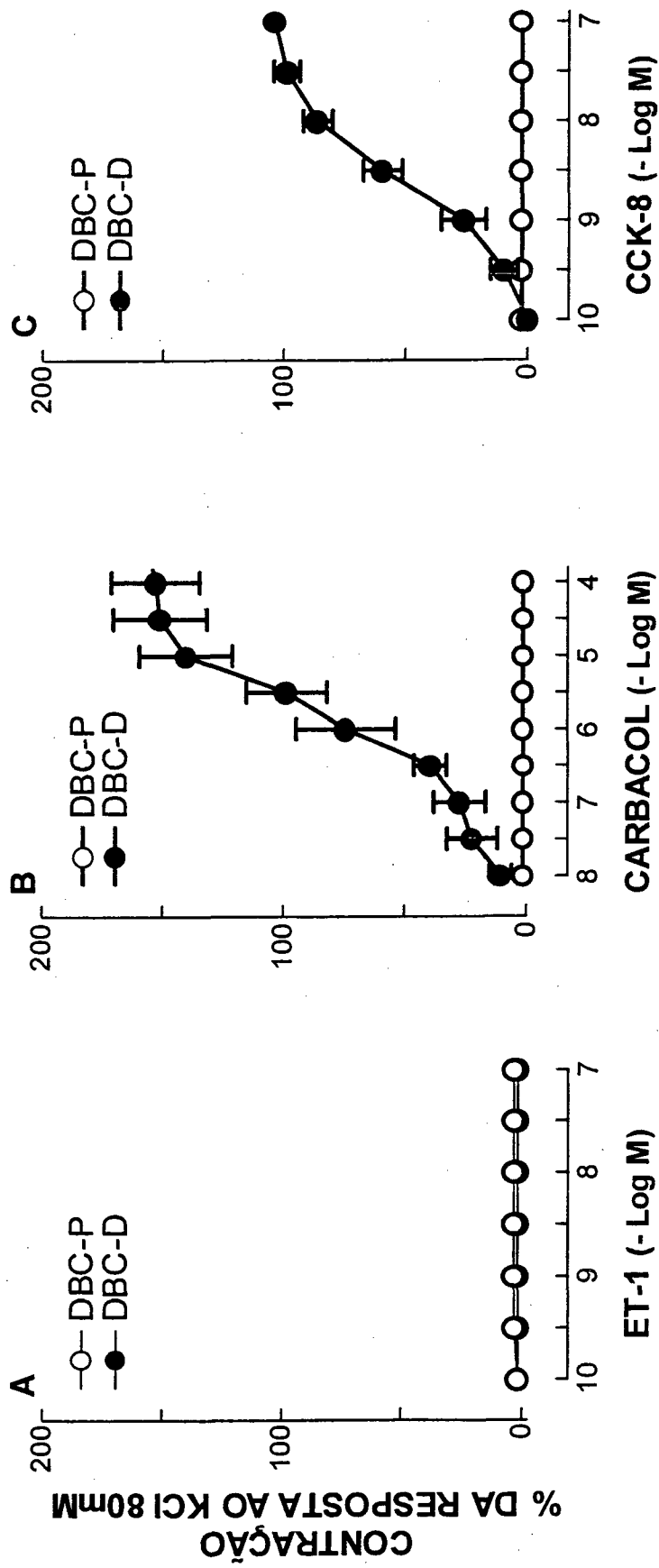
A adição de concentrações cumulativas e crescentes de carbacol (10 nM a 100  $\mu$ M) causou uma contração tônica gradativa da preparação DBC-D que foi dependente da concentração. Diferentemente, a CCK-8 (0,1 – 100

nM) somente induziu contrações tônicas da preparação DBC-D quando utilizou-se o método das doses isoladas. Além disso, nas concentrações utilizadas, a CCK-8 foi significativamente mais potente, porém causou um efeito máximo menor, do que o carbacol. Já a ET-1 (0,1 – 100 nM) não causou qualquer resposta contrátil do DBC-D. A **Figura 4** ilustra e a **Tabela 1** apresenta os resultados médios dos experimentos realizados com DBC-P e DBC-D.

### **4.2 – Influência da indometacina sobre respostas do DBC-D de cobaia a diferentes agonistas.**

Como demonstram os resultados apresentados na **Figura 5A**, embora a endotelina-1 não tenha induzido resposta contrátil em qualquer dos segmentos do DBC de cobaia, a incubação da preparação DBC-D com o inibidor não-seletivo das ciclooxygenases indometacina (5,6  $\mu$ M) revelou efeitos contráteis da endotelina-1. A indometacina também potencializou significativamente e de modo pronunciado as respostas ao carbacol (**Figura 5B**), aumentando a potência deste agonista em cerca de 500 vezes. Entretanto, a reatividade do DBC-D à CCK-8 não foi alterada pelo inibidor de ciclooxygenase (**Figura 5C**). As  $CE_{50}$ s (médias geométricas e limites de confiança para 95%) e  $E_{MAX}$ s para cada um desses agonistas na presença de indometacina estão apresentados na **Tabela 1**.

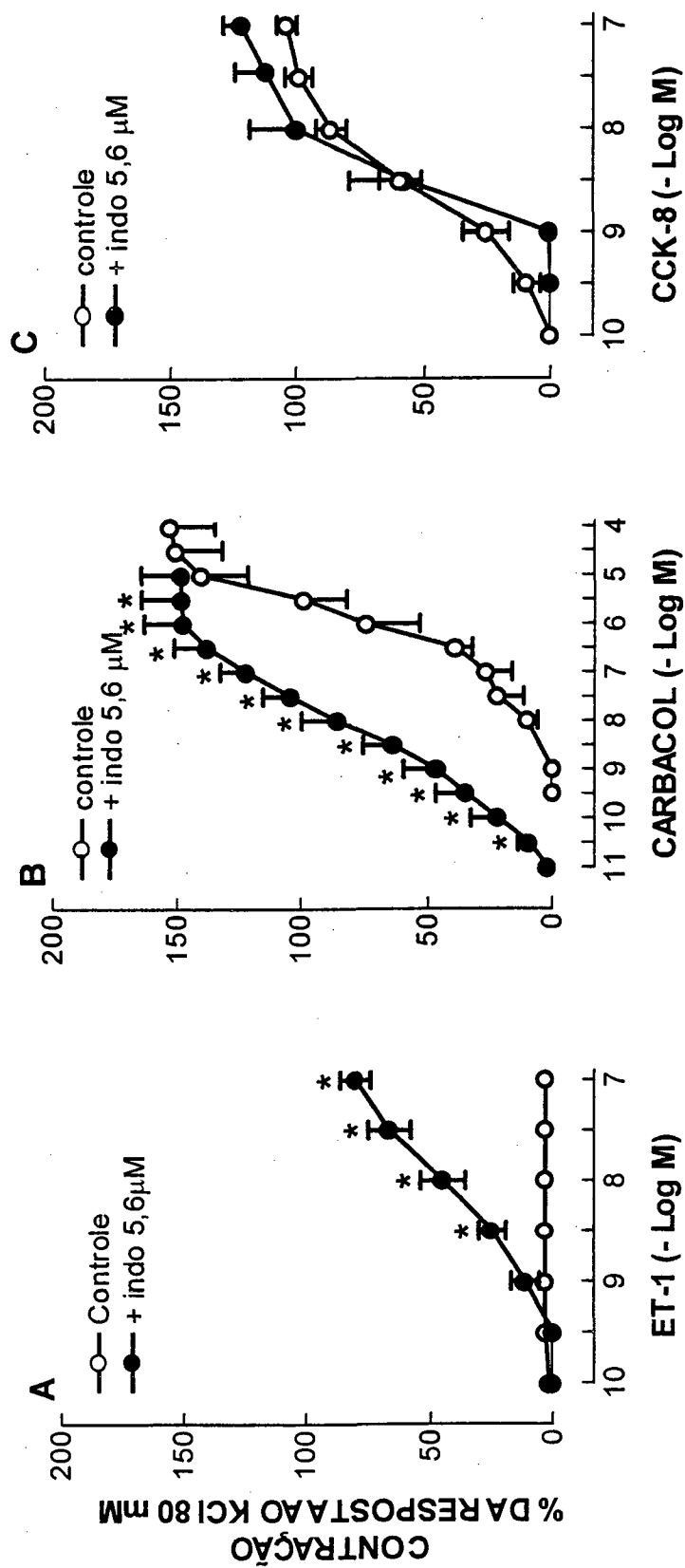




**FIGURA 4** – Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da endotelina-1 (ET-1) (painel A), carbacol (painel B) e colecistocinina-8 (CCK-8) (painel C) em anéis de ducto biliar comum segmento proximal (DBC-P) e distal (DBC-D) de cobaia. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 7 experimentos.

**TABELA 1-** Efeitos contráteis de diferentes agonistas em segmentos de ducto biliar comum distal (DBC-D) isolado de cobaia na ausência ou presença de indometacina (5,6  $\mu$ M). As  $CE_{50}$ s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. Os  $E_{MAX}$ s dos agonistas estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M., como porcentagens relativas da resposta de cada preparação ao KCl 80 mM. O valor "N" indica o número de experimentos. \*  $P \leq 0,05$  quando comparado ao valor correspondente na ausência de indometacina (teste t de Student, não pareado).

AGONISTA	CONDIÇÃO	$CE_{50}$ nM	$E_{MAX}$ (%)	N
Endotelina-1	Controle	Inativo até 100 nM	-	6
	+ Indometacina	7,8 (5,5-11,1)	80 $\pm$ 6 *	4
Carbacol	Controle	3870 (1720-8510)	156 $\pm$ 17	6
	+ Indometacina	6,6 (3,9-10,9)*	148 $\pm$ 16	6
CCK-8	Controle	4,52 (2,51-8,15)	104 $\pm$ 4	6
	+ Indometacina	3,71 nM (2,5-5,6)	122 $\pm$ 7	6
Histamina	Controle	Inativo até 100 $\mu$ M	-	5



**FIGURA 5** – Influência da Indometacina 5,6 μM (indo) na reatividade de anéis de ducto biliar comum distal (DBC-D) de cobaia à endotelina-1 (ET-1) (painel A), carbacol (painel B) e oolecistocina-8 (CCK-8) (painel C). Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 a 7 experimentos. \*P ≤ 0,05 (ANOVA seguido de teste t de Student).

### **4.3 – Comparação dos efeitos induzidos pela endotelina-1 e outros agonistas no esfíncter de Oddi (EO).**

A adição cumulativa de concentrações crescentes de carbacol (10 nM a 100  $\mu$ M) induziu contrações tônicas de ambas as porções do EO (EOA e EOP), sobrepostas a contrações fásicas rítmicas da preparação. Ambos os efeitos mostraram-se dependentes da concentração, e o componente tônico da contração apresentou, em ambas as preparações, um decaimento progressivo a partir de 3-5 min de exposição ao agonista. Em contraste, enquanto a CCK-8 causou pequenas contrações transitórias que decaíam rapidamente, a endotelina-1 não induziu quaisquer contrações destas preparações (**Figura 6A e 6B**). Além disso, a exemplo da ET-1, a sarafotoxina S6c (0,1-100 nM) e a histamina (10 nM a 100  $\mu$ M) também não induziram qualquer efeito contrátil em nenhuma das porções do EO (resultados não apresentados, n = 4 a 6 experimentos).

#### **4.3.1 – Influência da indometacina sobre a reatividade do esfíncter de Oddi à ET-1, carbacol e CCK-8.**

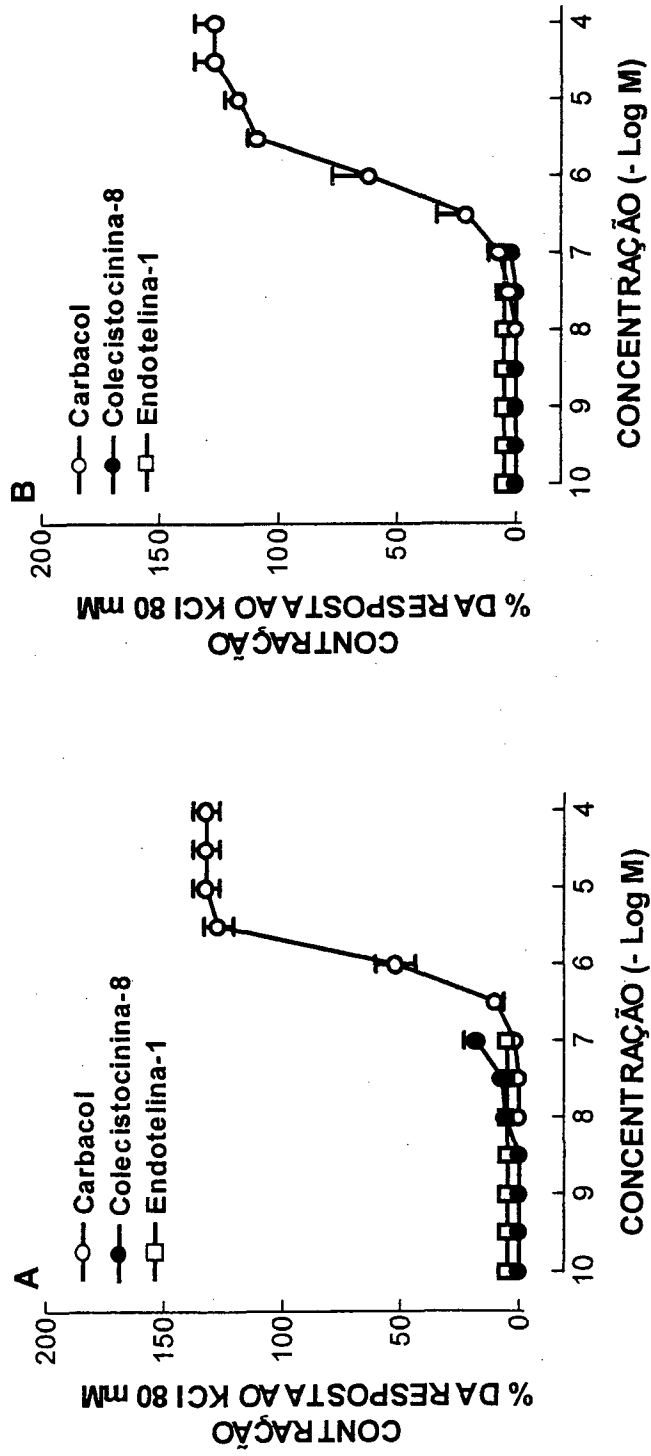
A incubação das preparações EOA ou EOP com o inibidor da ciclooxigenase indometacina, na dose de 5,6  $\mu$ M, não alterou significativamente as curvas concentração-efeito obtidas pela adição de doses isoladas e crescentes de carbacol a intervalos de 10 min, embora aumentasse tanto a ritmicidade basal dessas preparações como o aumento de ritmicidade estimulado pelo agonista colinérgico. No entanto, quando as curvas ao carbacol foram construídas pelo método das doses cumulativas, a indometacina potencializou os efeitos contráteis induzidos por concentrações

de eficácia submáxima do agonista (entre 0,1 e 1  $\mu\text{M}$ ) no EOA, mas não EOP. Os resultados médios desses experimentos são ilustrados na **Figura 7** e estão dispostos na **Tabela 2**.

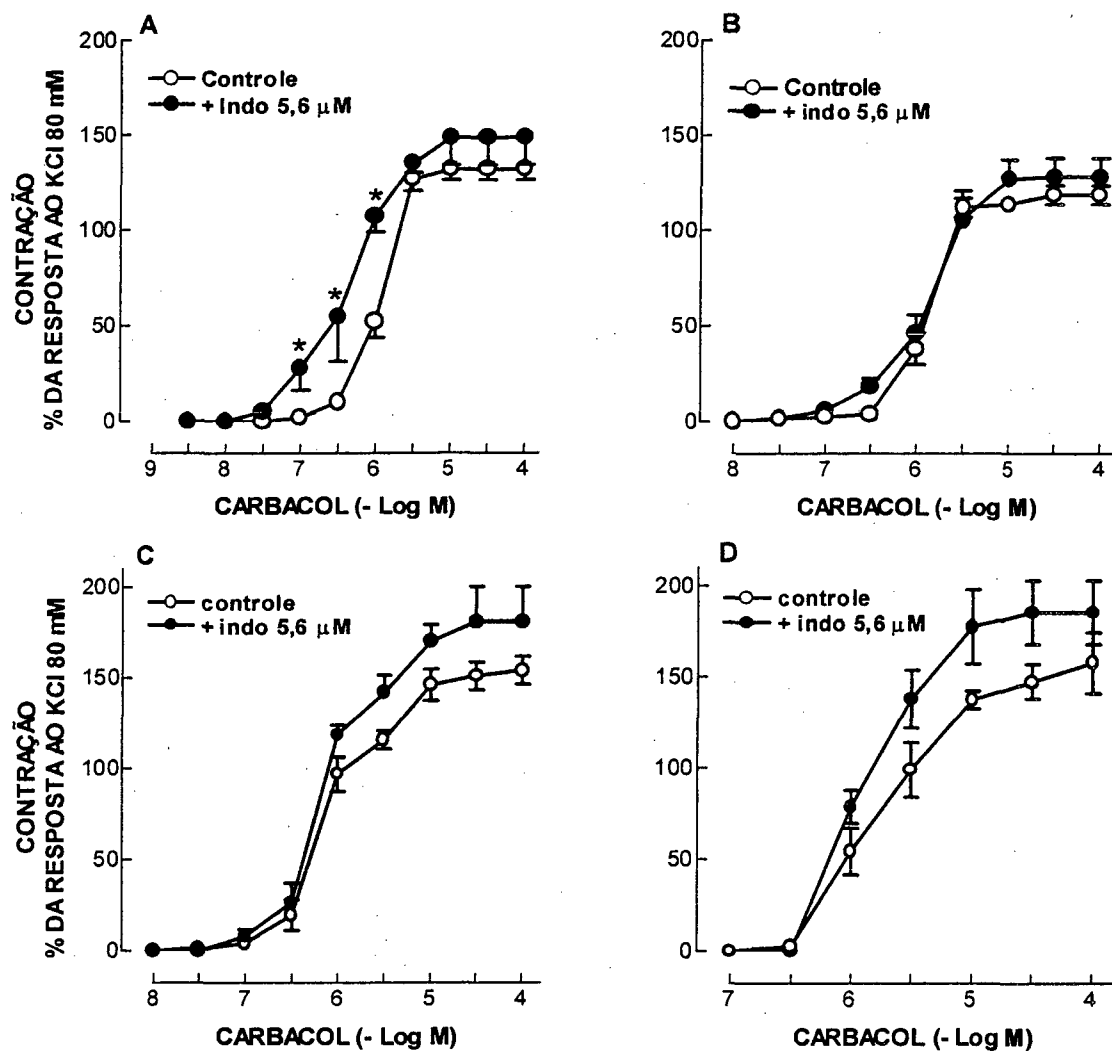
Por outro lado, a indometacina não modificou as respostas induzidas pela adição de doses isoladas ou cumulativas de ET-1 ou CCK-8 em quaisquer das porções do esfíncter de Oddi (resultados não apresentados, n=6).

### **4.3.2 – Efeito depressor da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c sobre as contrações induzidas pelo carbacol no EOA e EOP de cobaia.**

Como a ET-1 não induziu resposta contrátil do EOA ou do EOP, seja na ausência ou na presença de indometacina, avaliou-se a existência de um possível efeito inibitório do peptídeo sobre as respostas destas preparações ao carbacol. Para tal, cada preparação foi exposta a uma dose única de carbacol (1  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$ , para EOA e EOP respectivamente), primeiro na ausência e, 30 min depois, na presença de ET-1 ou sarafotoxina S6c, cada qual adicionada à cuba 2 min antes do agonista colinérgico (ver registro típico na **Figura 8**). Através deste protocolo pode-se observar que tanto a ET-1 (10-100 nM) quanto a sarafotoxina S6c (30-100 nM) causaram inibições da contração induzida pelo carbacol no EOA (**Figura 9A**), e que esse efeito foi dependente da concentração do agonista peptidérgico. Na concentração de 100 nM, as inibições de respostas ao carbacol causadas por ET-1 e sarafotoxina S6c foram de  $62,5 \pm 5 \%$  e  $45 \pm 9 \%$ , respectivamente. No entanto, em contraste ao observado no EOA, a ET-1 e a sarafotoxina S6c não interferiram significativamente com a magnitude das contrações induzidas pelo carbacol no EOP (**Figura 9B**).



**FIGURA 6** – Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis do carbacol, colesticocinina-8 e endotelina-1 em anéis de esfínter de Oddi porção ampular (painel A) e papilar (painel B) de cobaia. As curvas foram obtidas pela adição cumulativa de concentrações crescentes dos agonistas. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 7 experimentos.

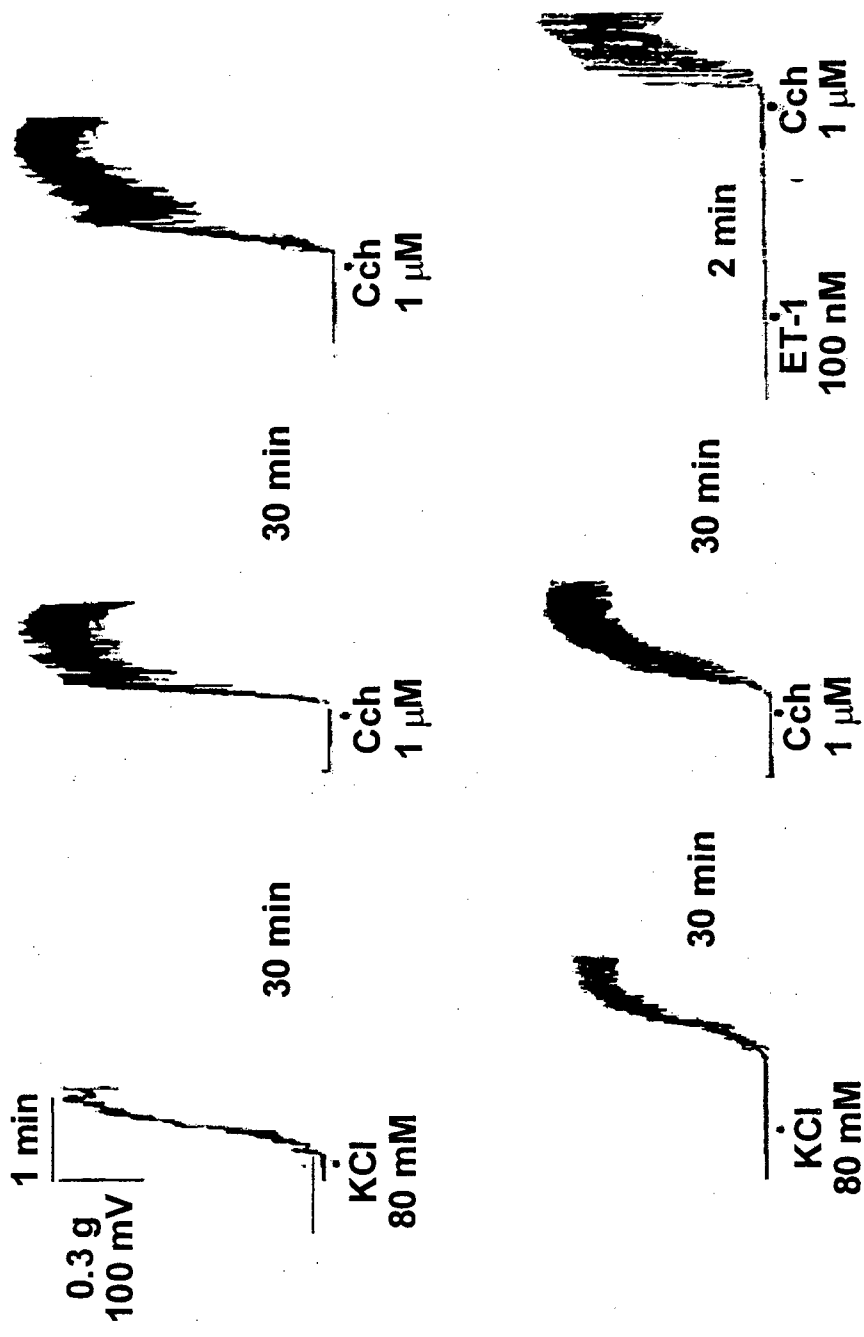


**FIGURA 7** – Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis do carbacol obtidos na ausência ou presença de indometacina 5,6 μM (indo) em anéis da porção ampular (painéis A e C) ou papilar (painéis B e D) do esfíncter de Oddi isolado de cobaia. As curvas apresentadas nos painéis A e B foram obtidas pelo método das doses cumulativas, enquanto as curvas obtidas nos painéis C e D foram construídas pela adição de doses isoladas. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 a 7 experimentos. \*P ≤ 0,05 quando comparado ao respectivo valor controle (ANOVA seguido de teste-t de Student).

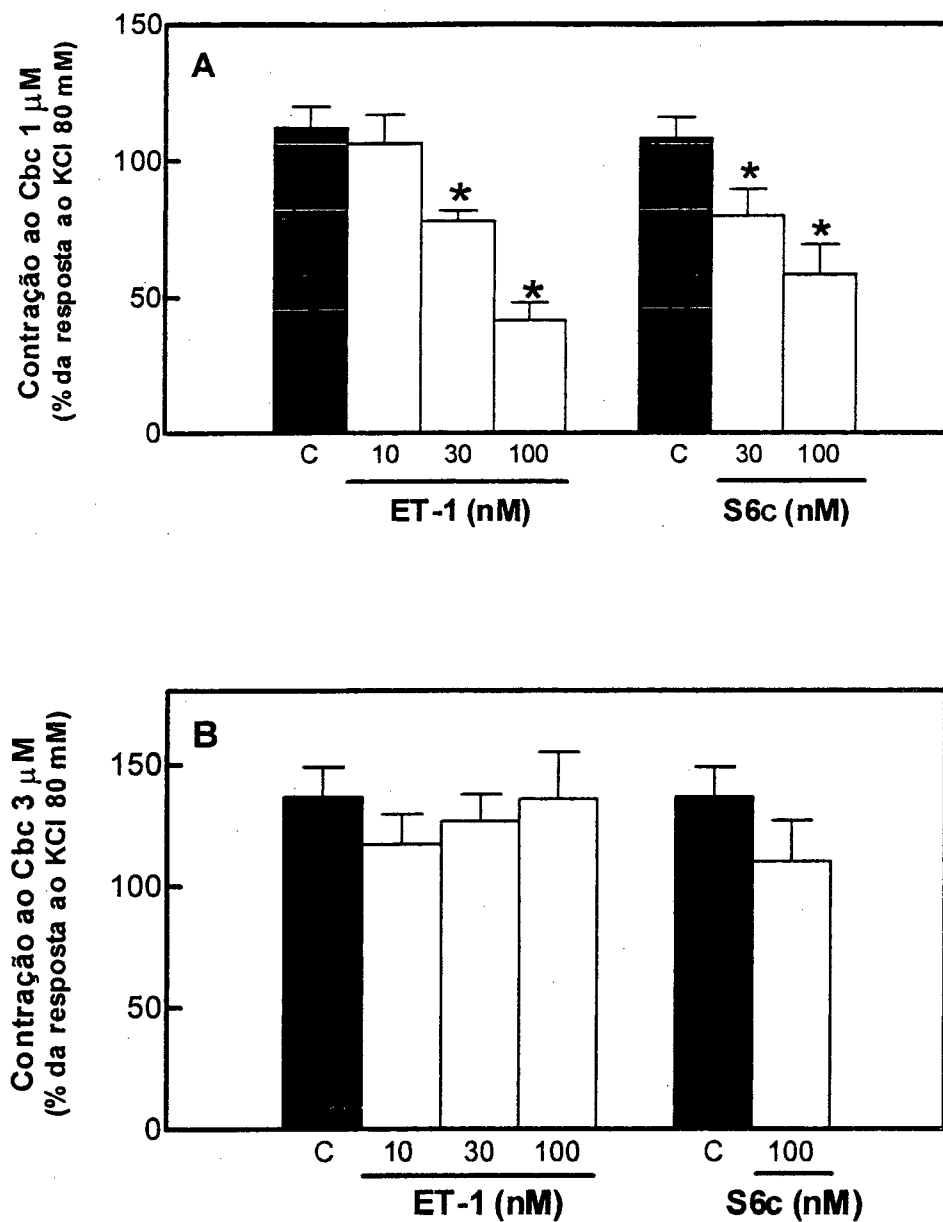
**TABELA 2** – Reatividade de anéis de esfíncter de Oddi isolado de cobaia ao carbacol na ausência ou presença de indometacina. As curvas ao agonista foram obtidas pelos métodos cumulativo ou das doses isoladas em preparações da porção ampular (EOA) ou papilar (EOP). As  $CE_{50}$ s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. Os  $E_{MAX}$ s dos agonistas estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos, como porcentagens relativas à reatividade de cada preparação ao KCl 80 mM.

Preparação	Grupo	Curva Cumulativa		Curva Doses Isoladas	
		$CE_{50}$ $\mu$ M	$E_{MAX}$ (%)	$CE_{50}$ $\mu$ M	$E_{MAX}$ (%)
EOA	Controle	1,62 (1,24-2,11)	132 $\pm$ 5,5	0,36 (0,03-3,6)	154 $\pm$ 7,6
	+ Indometacina	0,44 (0,14-1,40)	149 $\pm$ 14	0,26 (0,43-1,54)	181 $\pm$ 19,6
EOP	Controle	1,55 (1,17-2,05)	118 $\pm$ 5	0,35 (0,02-7,56)	157 $\pm$ 17
	+ Indometacina	1,66 (1,15-2,39)	128 $\pm$ 10	1,29 (0,52-3,25)	185 $\pm$ 17,6





**FIGURA 8** – Registro isométrico típico dos efeitos da ET-1 (100 nM) nas contrações induzidas por carbacol (Cch; 1 μM) em anéis de esfíncter de Oddi porção ampular (EOA) isolados de cobaia. Os traçados superiores representam respostas controle sucessivas ao carbacol a intervalos de 30 min. Os traçados inferiores representam o efeito depressor da ET-1 sobre as contrações induzidas pelo carbacol. Resultados semelhantes foram obtidos em pelo menos mais 10 experimentos.



**FIGURA 9** – Efeitos inibitórios da endotelina-1 (ET-1) e sarafotoxina S6c (S6c) sobre as contrações induzidas pelo carbacol em anéis de esfíncter de Oddi porções ampular (painel A) e papilar (painel B) de cobaia. A figura ilustra as contrações induzidas pelo carbacol na ausência (barras fechadas) ou presença de ET-1 ou S6c (barras abertas). Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. \*  $P \leq 0,05$  (ANOVA seguido de teste-t de Student).

Pôr outro lado, a CCK-8 na dose de 100 nM, foi inativa em ambas as preparações, ou seja, não inibiu as contrações induzidas pelo carbacol. Ao contrário, observou-se contrações tônicas transitórias que decaíam segundos após a administração do peptídeo (**Figura 10**). As contrações induzidas pelo carbacol não foram potencializadas significativamente pela CCK-8.

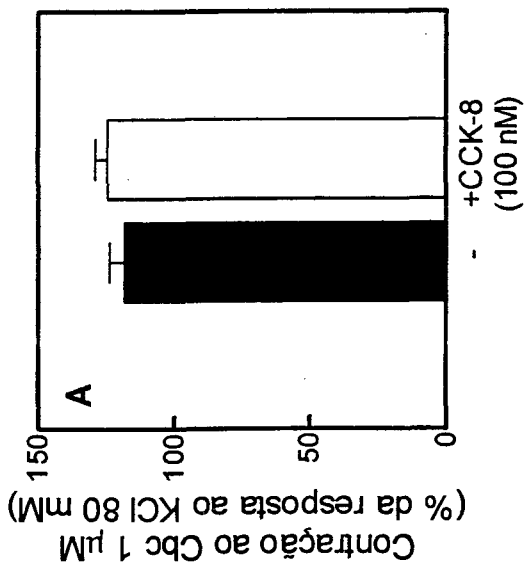
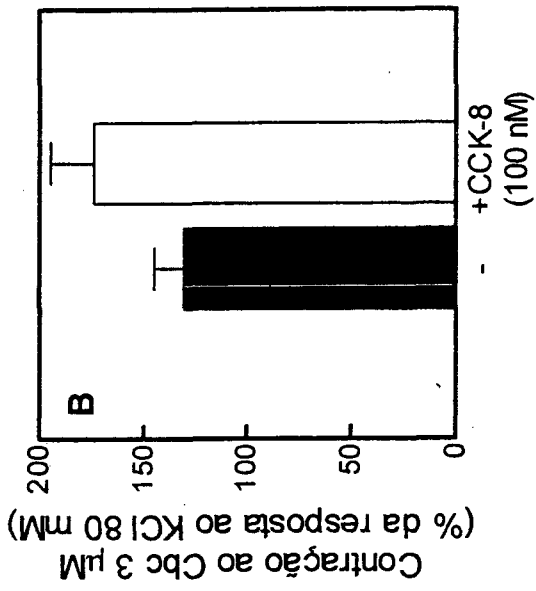
### **4.3.3 – Influência da indometacina no efeito depressor da endotelina-1 no esfíncter de Oddi de cobaia.**

A incubação de anéis de EOA com o inibidor não-seletivo das ciclooxigenases indometacina (5,6  $\mu$ M) resultou no bloqueio do efeito inibitório causado pela ET-1 (100 nM) sobre as contrações induzidas pelo carbacol (**Figura 11A**). Por outro lado, a indometacina não alterou as respostas do EOP à endotelina-1 (**Figura 11B**). Assim sendo, diferentemente do observado no DBC-D, a indometacina não desmascarou qualquer efeito contrátil da ET-1 no EOA ou no EOP.

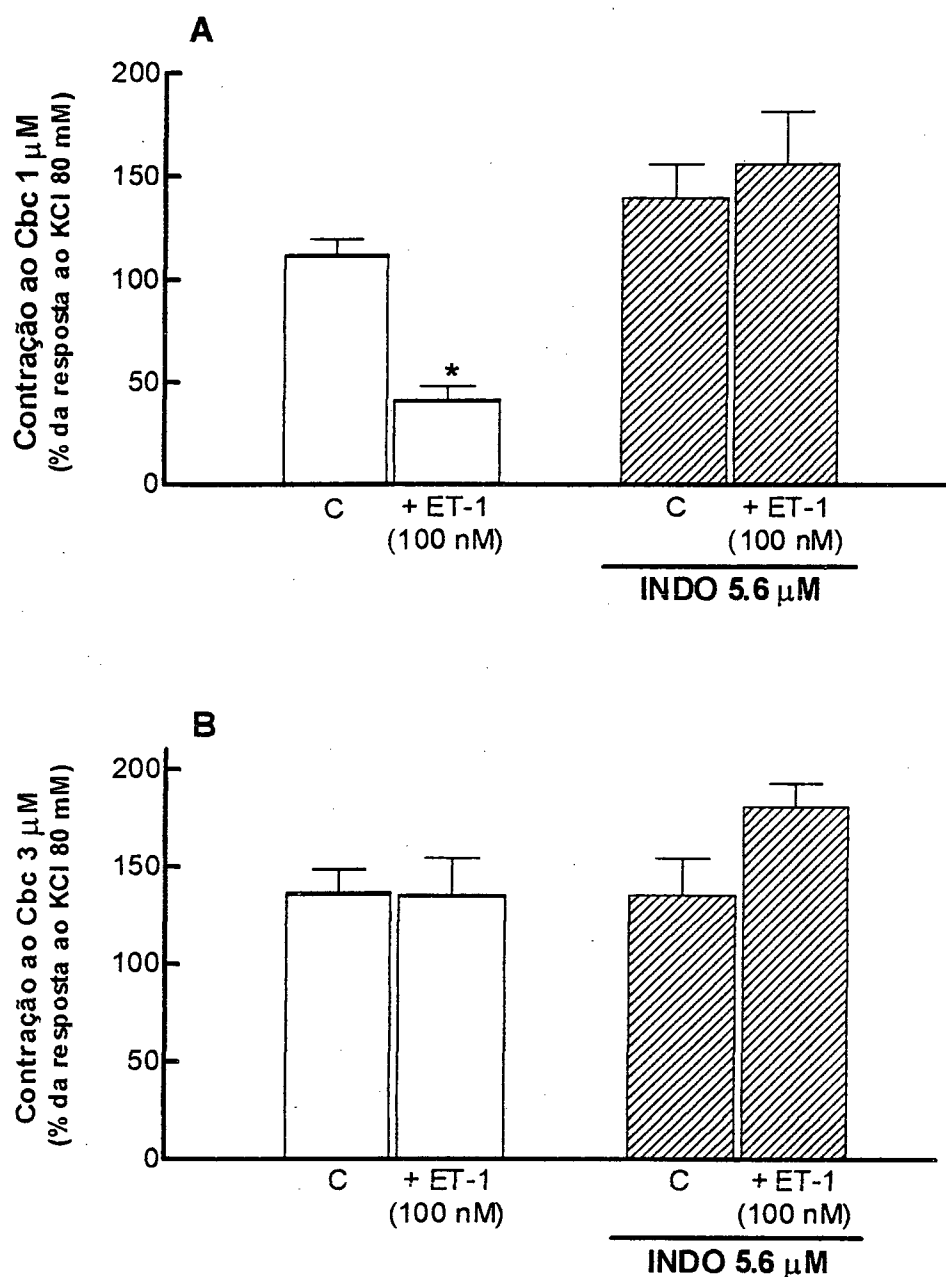
### **4.3.4 – Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos no efeito depressor da endotelina-1 no EOA de cobaia.**

A incubação prévia de anéis de EOA com o antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub> BQ-123 (1  $\mu$ M), 8 min antes da adição da ET-1 (i.e. 10 min antes da obtenção da segunda resposta ao carbacol), bloqueou parcialmente o efeito depressor do peptídeo (100 nM) sobre a contração induzida pelo carbacol (**Figura 12**). Em contraste, o bloqueio seletivo de receptores ET<sub>B</sub> com BQ-788 (1  $\mu$ M), que aboliu por completo o efeito depressor da sarafotoxina S6c sobre a contração induzida pelo carbacol, não afetou significativamente o

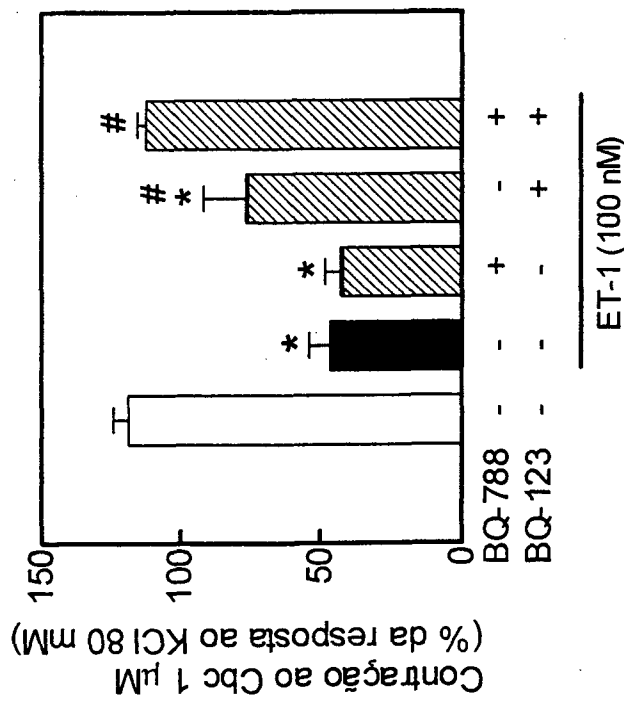
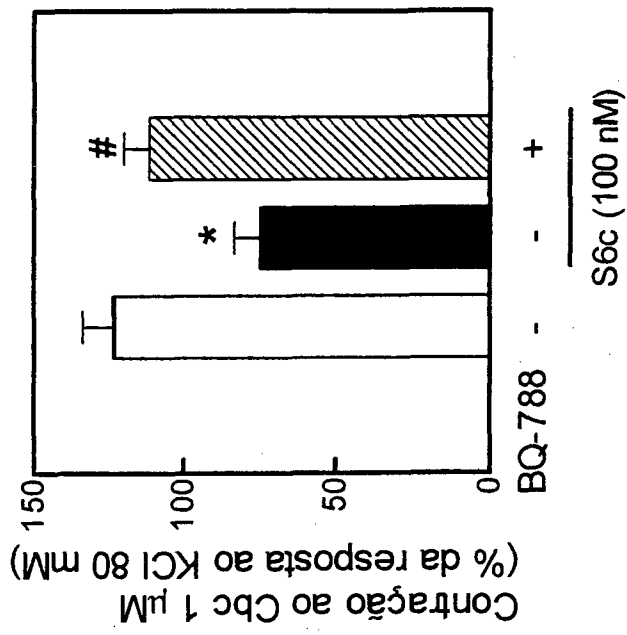
efeito depressor causado pela ET-1. Por fim, o efeito depressor induzido pela endotelina-1 foi totalmente abolido quando as preparações de EOA foram incubadas simultaneamente com ambos os antagonistas. Nenhum dos antagonistas modificaram a magnitude das respostas do EOA ao carbacol (N = 4, resultados não mostrados).



**FIGURA 10** – Efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) sobre as contrações induzidas pelo carbacol (Cbc) em anéis de porção ampular (EOA – painel A) ou porção papilar (EOP – painel B) de esfíncter de Oddi isolado de cobaia. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 experimentos. \* $P \leq 0,05$  (ANOVA seguido de teste-t de Student).



**FIGURA 11** – Influência da indometacina 5,6  $\mu\text{M}$  sobre o efeito inibitório da endotelina-1 (100 nM) na contração induzida por carbachol em anéis de porção ampular (painel A - EOA) e papilar (painel B - EOP) de esfíncter de Oddi isolado de cobaia. As barras abertas e achuradas representam contrações ao carbachol obtidas na ausência ou presença de indometacina, respectivamente. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. \*  $P < 0,05$  (ANOVA seguido por teste t de Student).



**FIGURA 12** – Influência do BQ-788 (1 μM), um antagonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub>, e/ou do BQ-123 (1 μM), um antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub>, sobre o efeito depressor da endotelina-1 (ET-1, painel A) e da sarafotoxina S6c (S6c, painel B) nas contrações induzidas pelo carbacol (1μM) em anéis de EOA isolados de cobaia. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 experimentos. \*P ≤ 0,05 em relação ao controle (barras abertas) e #P ≤ 0,05 em relação às respostas obtidas em presença de ET-1 ou sarafotoxina S6c na ausência de antagonistas (ANOVA seguido de teste-t de Student).

## 5 – DISCUSSÃO

O presente trabalho parece constituir, pelo que pudemos depreender, o primeiro estudo a avaliar os efeitos da ET-1 na motilidade de diversos tecidos integrantes do trato biliar extra-hepático de cobaia, quais sejam o ducto hepático, ducto cístico, ducto biliar comum e esfíncter de Oddi. Como evidenciamos diferentes atividades da ET-1 nas várias preparações, optamos por dividir a discussão em diferentes tópicos, na tentativa de facilitar sua compreensão.

### 5.1 – Efeitos da endotelina-1 e outros agonistas nos ductos do trato biliar extra-hepático

A adição de concentrações crescentes e cumulativas de ET-1 não produziu resposta contrátil em quaisquer dos ductos biliares da cobaia, quais sejam o ducto hepático, o ducto cístico e o DBC. Já os demais agonistas testados carbacol e CCK-8 induziram, ao contrário da ET-1, contrações rápidas e dependentes da dose somente no DBC-D (mas não do DBC-P), que foram prontamente revertidas quando da renovação da solução fisiológica. Por outro lado, o ducto hepático, o ducto cístico e a porção proximal do ducto biliar comum (DBC-P) não exibiram respostas contráteis ao KCl, carbacol, CCK-8 ou ET-1, assim como não apresentaram contrações fásicas espontâneas. Curiosamente, SUZUKI *et al.* (1988), utilizando tiras longitudinais de ducto hepático de cobaia, demonstraram que 42% das preparações testadas apresentavam contrações espontâneas, as quais não foram afetadas pela presença de tetrodotoxina, guanetidina ou atropina. Embora não tenhamos



evidenciado tais contrações espontâneas no ducto hepático, observamos que cerca de 70 % dos anéis obtidos do DBC-D (próxima ao duodeno), mas não do DBC-P, exibiram contrações rítmicas espontâneas. Tais achados sugerem que o DBC de cobaia é claramente dividido em duas porções com propriedades funcionais diferentes. Resultados semelhantes também foram obtidos em tiras circulares de DBC de coelho por MINKER *et al.* (1993). Embora os autores tenham dividido a DBC em três porções denominadas de porção esfíntérica, mediai e hepática, eles observaram que as diferentes porções exibiam diferentes reatividades para vários agonistas e antagonistas, sendo identificados receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, colinérgicos muscarínicos, receptores para bradicinina, histaminérgicos  $H_1$  e para prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . Somente a porção esfíntérica do DBC de coelho exibiu contrações espontâneas rítmicas bem evidentes, sendo que as demais porções apresentaram apenas pequenas contrações espontâneas e irregulares.

Um estudo recente demonstrou que, no trato biliar extra-hepático humano, a densidade da musculatura lisa apresenta-se muito baixa ou até inexistente no ducto hepático (HONG *et al.*, 2000). Porém, porções mais distais do ducto, na realidade já integrando o DBC-P, já apresentam uma maior densidade de músculo liso, disposto de modo difuso. Por fim, o terço mais distal, correspondendo ao DBC-D, apresenta a maior densidade de células musculares lisas, dispostas em parte de modo difuso e em outra de modo contínuo e organizado.

Por outro lado, CONNAT e CARRIER (1995) observaram que, em ratos mas não em cobaias, o lado hepático do DBC (DBC-P), que é ricamente vascularizado e apresenta densa inervação por fibras contendo CGRP

(peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), contrai espontaneamente ou em resposta à acetilcolina ou substância P. Já o lado duodenal (DBC-D), que é menos vascularizado e apresenta fibras com CGRP apenas no seu epitélio, não contrai espontaneamente e é insensível à acetilcolina ou substância P. Assim esses autores sugerem que a ausência de vesícula biliar e ducto pancreático no rato seja compensado funcionalmente pelos lados hepático e duodenal do DBC respectivamente.

No presente estudo, quando comparamos a potência dos diversos agonistas utilizados no DBC-D, observamos que a CCK-8 foi significativamente mais potente, porém menos eficaz, do que o carbacol. Há um relato de que, em tiras musculares longitudinais de DBC de cobaia, a CCK-8 evoca uma contração bifásica e liberação de  $[H^3]$ -acetilcolina (TAKAHASHI *et al.*, 1988). Curiosamente, indometacina pareceu não modificar as contrações induzidas pela CCK-8 em anéis de DBC-D de cobaia, embora potencializasse marcada e significativamente as respostas da mesma preparação ao carbacol. As razões que pudessem justificar essa discrepância entre os resultados de TAKAHASHI *et al.* (1988) e os do presente estudo nos são ainda desconhecidas. Nossos resultados sugerem fortemente que o efeito contrátil induzido por carbacol, mas não pela CCK-8, no DBC-D de cobaia são mediados por ou serem modulados pela produção de eicosanóides sintetizados pela via da ciclooxigenase.

Por outro lado, sabe-se que a produção de ET-1 pelo epitélio biliar humano é potencializada (aumentada) pela CCK-8 (HOUSSET *et al.*, 1993). Além disso, células epiteliais cultivadas da VB e do trato biliar intra- e extra-hepáticos humanos expressam RNAm para ET-1 e secretam esse peptídeo

(HOUSSET *et al.*, 1993). Portanto não descartamos a possibilidade de a ET-1 exercer alguma influência fisiologicamente importante no trato biliar terminal.

As ETs podem estimular a liberação de eicosanóides da via da ciclooxigenase (prostanóides) em vários tecidos (para revisão ver HYSLOP e DE NUCCI, 1992). Tal atividade contribui para reduzir os efeitos vasoconstritores da ET-1 em alguns tecidos perfundidos, como baço e rim isolados de coelho (RAE *et al.*, 1989), ou o leito coronariano de cobaia (FOLTA *et al.*, 1989). Em outros tecidos, como traquéia (FILEP *et al.*, 1991) e VB de cobaia (CARDOZO *et al.*, 1997), as contrações produzidas pela ET-1 são mediadas em parte pela liberação de prostanóides. No presente estudo, observamos que a incubação de anéis de DBC-D de cobaia com indometacina desmascarou efeitos contráteis da ET-1, ou seja, a preparação apresentou contrações significantes ao peptídeo apenas na presença do inibidor de ciclooxigenase indometacina. Portanto, ao contrário da VB, onde eicosanóides medeiam parte do efeito contrátil da endotelina, no DBC-D essas substâncias parecem modular de modo inibitório as ações contráteis do peptídeo. Contudo, nem todos os agonistas dependem de prostanóides para contrair esta preparação, pois a indometacina não afetou as respostas induzidas pela CCK-8.

## 5.2 – Efeito da endotelina-1 no Esfíncter de Oddi.

A adição de doses crescentes de ET-1, seja de modo isolado ou cumulativo, não causou contração em quaisquer porções do esfíncter de Oddi de cobaia, quais sejam, o EOA (próximo ao DBC), ou o EOP (próximo ao duodeno). No entanto, o carbacol causou contrações em ambas as porções

do esfíncter de Oddi, as quais foram relativamente sustentadas e dependentes da concentração, e a CCK-8 induziu apenas pequenas contrações transitórias, que decaíam rapidamente.

Estudos realizados em tiras longitudinais e em anéis circulares de esfíncter de Oddi humano, demonstraram que a CCK-8 causa relaxamento e o carbacol causa contração dos anéis circulares de EO; já as tiras longitudinais foram menos reativas aos agonistas (TOKUNAGA *et al.*, 1993). No entanto, o mecanismo de ação da CCK no EO não está claramente compreendido, devido às variações anátomo-fisiológicas que ocorrem entre as espécies. Sabe-se, até o momento, que o efeito contrátil induzido pela CCK-8 no EO de cobaia consiste de uma ação direta sobre a musculatura lisa, bem como de um efeito indireto mediado pela liberação de acetilcolina dos neurônios parassimpáticos pós-ganglionares (HARADA *et al.*, 1986). Por outro lado, há estudos demonstrando relaxamento do EO pela CCK-8, que se dá por via indireta, através da liberação de VIP (peptídeo intestinal vasoativo) das fibras nervosas NANC (WILEY *et al.*, 1988), assim como NO (óxido nítrico) (PAULETZKI *et al.*, 1993; SLIVKA *et al.*, 1994; TANOBE *et al.*, 1995; SZILVÁSSY *et al.*, 1996).

Embora a ET-1 não tenha apresentado efeito contrátil, quando incubamos a preparação com concentrações crescentes de ET-1, as contrações induzidas pelo carbacol no EOA foram marcadamente inibidas, o que sugere que o peptídeo module de modo inibitório as contrações tônicas e rítmicas induzidas pelo carbacol. O mesmo não foi observado para a CCK-8, pois a incubação das preparações com CCK-8 (100 nM) não alterou as respostas contráteis induzidas pelo carbacol. Além disso, nossos resultados,

sugerem fortemente que uma fração significativa do efeito depressor da ET-1 sobre as contrações rítmicas do carbacol no EOA parece depender da síntese de prostanóides, pois a incubação do tecido com indometacina, um inibidor da ciclooxigenase, bloqueou por completo o efeito inibitório da ET-1 (100 nM). Os experimentos realizados, contudo, não permitem estabelecer se os prostanóides medeiam diretamente ou se apenas modulam (i.e. facilitam) as respostas inibitórias do EOA à ET-1. Por outro lado, a ET-1, bem como a CCK-8, não modificaram as respostas contráteis induzidas pelo carbacol no EOP, tanto na ausência quanto na presença de indometacina. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o efeito depressor da ET-1 sobre as contrações tônicas e rítmicas induzidas pelo carbacol depende da porção analisada. Neste sentido, a exemplo do DBC, o EO de cobaia também apresenta duas porções com propriedades funcionais diferentes, no que se refere às respostas induzidas por ET-1. Porém, diferentemente do DBC-D, onde a ET-1 parece causar um efeito depressor mediado por prostanóides que limita seu efeito contrátil direto, no EO não pudemos evidenciar qualquer efeito contrátil deste peptídeo, nem na presença de indometacina.

VONGALIS *et al*, (1989), através de estudos eletrofisiológicos, registraram respostas contráteis mediadas por estimulação nervosa em anéis de EO de cobaia divididos em três regiões anatomicamente distintas (esfincter colédoco, ampula e papila). Estes autores concluíram que a resposta contrátil e os potenciais excitatórios evocados por estimulação elétrica transmural, são mais evidentes ou pronunciados no esfincter colédoco (porção ampular em nosso estudo), enquanto os potenciais inibitórios são maiores em preparações provenientes da ampula (porção papilar em nosso estudo). Sendo assim,

provavelmente estas regiões possuem diferentes funções na motilidade do EO. Também, HIROSE e ITO, (1991), os quais dividiram o EO de cobaia em três áreas, mostraram diferenças regionais nas respostas neurogênicas excitatórias e inibitórias. Na área III (correspondente à porção papilar utilizada em nosso estudo) predominam as respostas inibitórias mediadas por estimulação de nervos NANC. Por outro lado, nas áreas I e II (correspondente à porção ampular utilizada em nosso estudo, que é sensível aos efeitos inibitórios da ET-1), predominam respostas excitatórias mediadas pela estimulação de nervos colinérgicos.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a ET-1 não causa contração de anéis de EO isolados de cobaia. Ao contrário, o agonista parece inibir, via síntese de prostanóides, as contrações tônicas e rítmicas induzidas pelo carbacol em anéis de EOA, mas não de EOP.

### **5.2.1 - Caracterização de receptores endotelinérgicos.**

Parte do presente estudo procurou caracterizar os receptores endotelinérgicos que medeiam o efeito depressor da ET-1 sobre as contrações rítmicas induzidas pelo carbacol no EOA. Para isso, fez-se uso de duas abordagens distintas: a) a comparação das atividades de dois agonistas de receptores endotelinérgicos; e b) uma análise da influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos.

Com relação à primeira abordagem, convém lembrar que, até o presente, foram clonados apenas dois receptores endotelinérgicos dos genomas de mamíferos: o receptor ET<sub>A</sub>, que apresenta maior afinidade pela ET-1 e ET-2 do que pela ET-3 (ARAI *et al.*, 1990); e o receptor ET<sub>B</sub>, que não

discrimina entre esses três isopeptídeos e é ativado seletivamente por alguns agonistas, como sarafotoxina S6c, o IRL 1620 e o BQ-3020 (SAKURAI *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1991; TAKAI *et al.*, 1992; IHARA *et al.*, 1992).

A ET-1 e o agonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub> sarafotoxina S6c foram ativos em inibir as contrações induzidas pelo carbacol no EOA isolado de cobaia. No entanto, a ET-1 mostrou-se mais eficaz (i.e. causou maiores percentagens de inibição) que a sarafotoxina S6c em inibir o efeito contrátil induzido pelo carbacol no EOA isolado de cobaia. Esses resultados sugerem que pelo menos parte dos receptores ativados pela ET-1 na porção ampular do EO de cobaia sejam do tipo ET<sub>B</sub>.

A segunda abordagem visando a caracterização dos receptores endotelinérgicos em anéis de EOA avaliou os perfis de ação da ET-1 e da sarafotoxina S6c na presença de dois antagonistas: o BQ-123, um antagonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>A</sub> (IHARA *et al.*, 1992) e o BQ-788, um antagonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>B</sub> (TANAKA *et al.*, 1994). Os nossos achados revelaram que a incubação da preparação com BQ-123 (1  $\mu$ M) aboliu parcialmente o efeito depressor da ET-1. Dessa maneira, podemos sugerir que uma parcela significativa dos receptores endotelinérgicos envolvidos na mediação do efeito depressor da ET-1 sobre as contrações rítmicas induzidas pelo carbacol é do tipo ET<sub>A</sub>. O BQ-788 (1  $\mu$ M), por sua vez, não modificou o efeito depressor induzido pela ET-1, mas claramente aboliu a inibição causada pela sarafotoxina S6c. Resultados semelhantes foram obtidos por CARDOZO *et al.* (1997) na VB isolada de cobaia, onde o BQ-788, na concentração de 300 nM e 1  $\mu$ M, antagonizou as respostas contráteis

produzidas pela ET-3 e sarafotoxina S6c de modo concentração-dependente, embora não tenha alterado a curva concentração-efeito à ET-1.

O fato dos efeitos depressores da ET-1 não terem sido bloqueados totalmente por nenhum dos antagonistas utilizados, levou-nos a testar a influência da associação dos dois antagonistas (BQ-123 e BQ-788). A incubação prévia de ambos os antagonistas inibiu por completo a resposta depressora da ET-1 sobre as contrações tônicas e rítmicas do carbacol. Nossos resultados se assemelham aos relatados por FUKURODA *et al.* (1994), que demonstraram que as contrações induzidas por ET-1 na artéria pulmonar de coelho não são inibidas isoladamente pelo BQ-123 ou pelo BQ-788 (cada qual a 10  $\mu$ M). No entanto, a associação dos dois antagonistas resultou em virtual supressão da resposta vasoconstritora à ET-1. Os resultados por nós obtidos, portanto, nos levam a concluir que o EOA de cobaia apresenta tanto receptores ET<sub>A</sub> quanto ET<sub>B</sub> que medeiam depressão da reatividade da preparação ao carbacol, sendo que apenas o bloqueio simultâneo de ambos os receptores resulta em antagonismo dos efeitos da ET-1. No entanto, vários aspectos quanto à natureza desses receptores e suas interações com agonistas e antagonistas permanecem a ser explorados mais profundamente.

### **5.3 – Influência de eicosanóides da via da ciclooxigenase nas ações da ET-1 sobre a motilidade do trato biliar extra-hepático.**

Através de dados obtidos na literatura e em nossos experimentos, torna-se clara a influência dos produtos da via da ciclooxigenase sobre as ações da ET-1 nos tecidos que compõem o trato biliar extra-hepático. Na VB, por exemplo, a incubação de tiras de vesícula biliar de cobaia com indometacina,



um inibidor da ciclooxigenase, reduz significativamente a reatividade da preparação à ET-1 (CARDOZO *et al.*, 1997), ainda que o resultado não tenha sido corroborado por outro estudo (MOUMMI *et al.*, 1992). Assim, uma fração significativa do efeito contrátil da ET-1 na VB isolada de cobaia parece depender da síntese de prostanóides. A identidade do(s) prostanóide(s) liberados pela VB de cobaia em resposta à ET-1 permanece a ser esclarecida. Porém, sabe-se que a PGE<sub>2</sub> contrai a VB de cobaia (NAKATA *et al.*, 1981; OCCHIPINTI, 1978; CABRINI *et al.*, 1995). No entanto, parece pertinente mencionar, que o tromboxanomimético U46619 é muito mais potente em contrair a vesícula biliar de cobaia que as prostaglandinas F<sub>2α</sub> ou E<sub>2</sub> (CABRINI *et al.*, 1995).

Embora existam poucos estudos relacionados ao DBC, em nossos experimentos, observamos que os eicosanóides derivados da via da ciclooxigenase parecem mascarar as respostas contráteis induzidas pela ET-1, pois, com a incubação da preparação com indometacina, a ET-1 passou a apresentar um efeito contrátil nesta preparação. Os prostanóides também exercem uma influência importante no EOA (mas não no EOP), pois a incubação da preparação com indometacina aboliu o efeito inibitório da ET-1 sobre as contrações induzidas pelo carbacol. Além disso, as respostas de anéis de EOP ao carbacol na presença ou ausência de indometacina, não foram alteradas quando da utilização do método de curvas cumulativas ou do método das doses isoladas. No entanto, ao contrário do observado no EOP, a indometacina potencializou as respostas do EOA a

adições cumulativas de concentrações de eficácia sub-máxima de carbacol (0,1 a 1 μM). Isto sugere fortemente uma modulação mediada por

eicosanóides da via da ciclooxygenase nas respostas do EOA, mas não do EOP de cobaia. Sabe-se que a PGE<sub>2</sub> diminui as contrações fásicas induzidas pela ACh no EO de cobaia, já a PGF<sub>2α</sub> não altera estas contrações (GOCER *et al.*, 1995). Além disso, a PGE<sub>2</sub> relaxa o EO de cobaia (OCCHIPINTI, 1978). Considerando o fato de que a PGE<sub>2</sub> contrai a vesícula biliar e relaxa o EO, e que a ET-1 contrai a VB e inibe a contratilidade do EOA via síntese de eicosanóides gerados por ação da ciclooxygenase, seria interessante testar, no futuro, se a ET-1 e demais ETs efetivamente induzem liberação de prostaglandina E<sub>2</sub> ou de outro eicosanóide nesses tecidos.

#### **5.4 – Implicações fisiológicas ou fisiopatológicas.**

Evidências funcionais demonstrando a participação das ETs no controle do fluxo biliar sugerem que estes peptídeos possam desempenhar funções fisiológicas relevantes no trato biliar, e talvez até que possam estar envolvidos em patologias associadas a esse trato. ISALES *et al.* (1993) constataram que a infusão de ET-1 induz colestase no fígado perfundido de rato por vasoconstrição hepática, com conseqüente aumento na pressão portal e decréscimo do fluxo biliar. A ET-1 também parece participar na manutenção do fluxo biliar, aumentando a freqüência de contração dos canalículos biliares de rato (KAMIMURA *et al.*, 1993), e na regulação da motilidade do ducto colédoco (KRAUS *et al.*, 1995). Além disso, células epiteliais cultivadas da vesícula biliar humana expressam RNAm para ET-1 e secretam quantidades apreciáveis do peptídeo (HOUSSET *et al.*, 1993) que, por sua vez, parece ser um agente contrátil extremamente potente na VB isolada de cobaia (BATTISTINI *et al.*, 1994; CARDOZO *et al.*, 1997).

No presente trabalho, evidenciamos que a ET-1 exerce efeitos contrários nos diferentes componentes do trato biliar extra-hepático. Por um lado, a ET-1 contrai o DBC, sendo esta contração inibida por prostanóides, e por outro lado, o peptídeo exerce um efeito depressor sobre o EO, mediado por receptores tanto ET<sub>A</sub> quanto ET<sub>B</sub> via síntese de prostanóides. Apesar dessas evidências, não está claro se a ET-1 efetivamente participa na regulação da atividade dos diferentes componentes do trato biliar. A disponibilidade recente de antagonistas de receptores endotelinérgicos não-peptídicos, mais resistentes à degradação enzimática e ativos por via oral, talvez possa auxiliar na elucidação, dentro em breve e através de estudos *in vivo*, dos possíveis papéis fisiológicos da ET-1 nesse sistema.

No entanto, os produtos da via ciclooxigenase podem estar relacionados a alguns tipos de patologias do trato biliar. Estudos realizados em pacientes com discinesias do trato biliar detectaram aumento nos níveis basais de PGE<sub>1</sub> e um discreto aumento dos níveis de PGF<sub>2α</sub> durante o reflexo vesical. Esses achados sugerem que as prostaglandinas possam ser fatores predisponentes de discinesias biliares (VOROB'EV e SALOVA, 1995). Além disso, a colecistite aguda, induzida experimentalmente por ligação do ducto biliar, está associada a um aumento da síntese de PGI<sub>2</sub> na VB de coelho (MYERS *et al.*, 1993). Em circunstâncias fisiopatológicas como a inflamação da VB humana, ocorre um aumento significativo da síntese de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>1α</sub> (MYERS *et al.*, 1992).

Conforme exposto acima, parte das ações da ET-1 na VB e no EOA são dependentes de prostanóides, ao contrário do DBC-D onde estes prostanóides inibem as respostas ao peptídeo. Portanto, estudos complementares seriam importantes para analisar uma possível relação entre a alteração na síntese de

eicosanóides e os níveis e/ou ação da ET-1 na musculatura lisa da VB, do EO e do DBC-D em modelos experimentais de discinesia biliar. Por outro lado, há também evidências de que a indometacina, por inibir as ciclooxigenases, pode causar discinesia do EO por aumento das contrações rítmicas espontâneas em consequência da inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> e a discinesia do EO pode resultar em colestase (YASAR et al., 1999). Como os prostanóides são importantes mediadores/moduladores das ações induzidas por ET-1 na VB, DBC-D e EOA de cobaia, pode-se sugerir alguma implicação da ET-1 nestas patologias.

Apesar das limitações impostas a estudos conduzidos *in vitro* com tecidos contendo musculatura lisa, os perfis distintos de ação da ET-1 em diferentes tecidos do trato biliar extra-hepático podem ser integrados de maneira a vislumbrar um papel fisiológico deste peptídeo. Considerando que a ET-1 é sintetizada pelo epitélio biliar (HOUSSET et al., 1993), sua ação contrátil eicosanóide-dependente sobre a musculatura lisa subjacente da VB, aliada ao seu efeito depressor (também eicosanóide-dependente) no DBC-D e no EOA, poderia contribuir para o extravasamento de bile para o duodeno. A confirmação desta hipótese ainda aguarda estudos mais aprofundados *in vivo*. Porém, a possibilidade da indometacina induzir colestase por aumento do tono do EO (YASAR et al., 1999), reforça a possível importância fisiológica do relaxamento da EOA em resposta à ativação de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> pela ET-1, demonstrado no presente estudo.

## CONCLUSÕES

O presente estudo procurou avaliar os efeitos da ET-1 sobre a motilidade de diferentes porções do trato biliar extra-hepático, incluindo os ductos hepático, cístico e biliar comum (DBC) e o esfíncter de Oddi (EO) isolados de cobaia, bem como caracterizar a possível participação de prostanóides nas ações da ET-1 nestas preparações e identificar os receptores endotelinérgicos que medeiam os efeitos da ET-1 no esfíncter de Oddi isolado de cobaia. As preparações foram montadas para registro de contrações isométricas em cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, borbulhada com 5% de CO<sub>2</sub> em O<sub>2</sub>.

Os experimentos realizados com a ET-1 revelaram que:

1 – A ET-1 (0,1 a 100 nM) não causou qualquer resposta contrátil do ducto hepático e do ducto cístico, assim como a CCK-8 (0,1 a 100 nM), a histamina, o carbacol (10 nM a 100 μM) ou o KCl 80 mM.

2 – Da mesma forma, a ET-1(0,1 a 100 nM) e os demais agonistas citados acima não causaram qualquer resposta contrátil do DBC-P. Contudo, no DBC-D, o carbacol (10 nM a 100 μM) e a CCK-8 (0,1 a 100 nM) causaram uma contração tônica gradativa da preparação. Além disso, a CCK-8 foi 850 vezes mais potente do que o carbacol (ao nível da CE<sub>50</sub>) apesar de induzir E<sub>MAX</sub> menor [Carbacol: CE<sub>50</sub> 3,87 μM (1,72-8,51), E<sub>MAX</sub> 156 ± 17%; CCK-8: CE<sub>50</sub> 4,52 nM (2,15-8,15), E<sub>MAX</sub> 104 ± 4%]. Já a ET-1 não causou qualquer resposta contrátil do DBC-D.

3 – A incubação da preparação DBC-D com o inibidor da ciclooxigenase indometacina (5,6  $\mu$ M) desmascarou efeitos contráteis da ET-1 [ $CE_{50}$  7,8 nM (5,5-11,1),  $E_{MAX}$   $80 \pm 6\%$ ]. A indometacina também potencializou em cerca de 500 vezes as respostas ao carbacol [ $CE_{50}$  6,6 nM (3,9-10,9),  $E_{MAX}$   $148 \pm 16\%$ ], porém não alterou a reatividade do DBC-D à CCK-8 [ $CE_{50}$  3,71 nM (2,5-5,6),  $E_{MAX}$   $122 \pm 7\%$ ].

4 – A ET-1, a sarafotoxina S6c (0,1-100 nM) e a histamina (10 nM a 100  $\mu$ M) não induziram qualquer efeito contrátil em nenhuma das porções do EO. Em contraste, enquanto o CCK-8 causou pequenas contrações transitórias que decaíam rapidamente, o carbacol induziu contrações tônicas e rítmicas de ambas as porções do EO [ $CE_{50}$  1,62 nM (1,24-2,11),  $E_{MAX}$   $132 \pm 5,5\%$  para EOA;  $CE_{50}$  1,55 nM (1,17-2,05),  $E_{MAX}$   $118 \pm 5\%$  para EOP].

5 - A incubação de anéis de EOA e EOP com o inibidor da ciclooxigenase indometacina (5,6  $\mu$ M) não modificou as respostas induzidas pela adição de doses isoladas ou cumulativas de ET-1 ou CCK-8. Por outro lado, a indometacina potencializou os efeitos contráteis induzidos pelo carbacol (0,1 a 1 $\mu$ M) no EOA, mas não EOP, quando as curvas ao carbacol foram construídas pelo método das doses cumulativas.

6 – Embora a ET-1 não tenha induzido resposta contrátil no EOA e EOP, seja na ausência ou na presença de indometacina, a incubação das preparações com ET-1 (10 – 100 nM) ou sarafotoxina S6c (30 – 100 nM) causou inibição da contração induzida pelo carbacol no EOA e esse efeito foi dependente da concentração do agonista peptidérgico. Na dose de 100 nM, as inibições causadas por ET-1 e sarafotoxina S6c foram de  $62,5 \pm 5 \%$  e  $45 \pm 9$

%, respectivamente.. No entanto, a ET-1 e a sarafotoxina S6c não interferiram significativamente com a magnitude das contrações induzidas pelo carbacol no EOP. Além disso, a CCK-8 (100 nM) não inibiu as contrações induzidas pelo carbacol em ambas as porções do EO.

7 - A incubação de anéis de EOA com indometacina, resultou no bloqueio do efeito inibitório causado pela ET-1 (100 nM) sobre as contrações induzidas pelo carbacol. Por outro lado a indometacina não alterou as respostas do EOP à ET-1. Assim sendo, diferentemente do observado no DBC-D, a indometacina não desmascarou qualquer efeito contrátil da ET-1 no EOA ou no EOP.

8 - A incubação de anéis de EOA com o antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub> BQ-123 (1 μM), bloqueou parcialmente o efeito depressor do peptídeo (100 nM) sobre a contração induzida pelo carbacol (1 μM).

9 - O BQ-788 (1 μM), antagonista seletivo de receptores do tipo ET<sub>B</sub>, não afetou significativamente o efeito depressor causado pela ET-1, mas aboliu por completo o efeito depressor da sarafotoxina S6c sobre a contração induzida pelo carbacol. O efeito depressor induzido pela ET-1 foi totalmente abolido quando as preparações de EOA foram incubadas com ambos os antagonistas, BQ-123 e BQ-788.

10 - Tais achados permitem concluir que a ET-1 não causa qualquer efeito contrátil em nenhuma das porções do trato biliar extra-hepático, quais sejam os ductos cístico, hepático e biliar comum e o esfíncter de Oddi isolados de cobaia. No entanto, no DBC-D, a ET-1 parece causar um efeito depressor mediado por prostanóides que limita seu efeito contrátil direto. Além disso, a ET-1 inibe, as contrações rítmicas induzidas pelo carbacol em anéis de EOA

(mas não EOP), e este efeito modulatório inibitório da ET-1 depende da ativação de receptores tanto ET<sub>A</sub> quanto ET<sub>B</sub> e da síntese de prostanóides.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS JR, R. B.; CHAPMAN, W. C.; REDDY, V. S. Embryology, anatomy and surgical applications of the extrahepatic biliary system. *Surg. Clin. North. Am.* **80**: 363-379, 2000.

AMBAR, I.; SOLOKOVSKY, M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur. J. Pharmacol.*, **245**: 31-45, 1993.

ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**: 730-732, 1990.

ASBERT, M.; GINES, A.; GINES, P.; JIMENEZ, W.; CLARIA, J.; SALO, J.; ARROYO, V.; RIVERA, F.; RODES, J. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology*, **104**: 1485-1491, 1993.

BATTISTINI, B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SIROIS, P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.*, **68**: 600-628, 1993.

BATTISTINI, B.; O'DONNELL, L. J. D.; WARNER, T. D.; FOURNIER, ALAIN.; FARTHING, M. J. G.; VANE, J. R. Characterization of endothelin (ET) receptors in the isolated gall bladder of the guinea-pig: evidence for an additional ET receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.*, **112**: 1244-1250, 1994.

BATTISTINI, B.; WOODS, M.; O'DONNELL, L. J. D.; WARNER, T. D.; CORDER, R.; FOURNIER, ALAIN.; FARTHING, M. J. G.; VANE, J. R. Contractile activity of endothelin precursors in isolated gallbladder of the guinea-pig: presence of an endothelin-converting enzyme. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1383-1390, 1995.

- BAX, W. A.; SAXENA, P. R. The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 379-386, 1994.
- BAYNASH, A.G.; HOSODA, K.; GIAID, A.; RICHARDSON, J. A.; EMOTO, N.; HAMMER, R. E.; YANAGISAWA, M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, **79**: 1277-1285, 1994.
- BILLAH, M.M.; ANTHES, J.C.; MULLMANN, T.J. Receptor-coupled phospholipase D: regulation and functional significance. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**: 322-329, 1991.
- BLACK, P. N.; GHATEI, M. A.; TAKAHASHI, D.; BERTHINGTON-WATT, D.; KRANSZ, T.; DOLLERY, C. T.; BLOMM, S. R. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett.*, **225**: 129-132, 1989.
- BLITZER, B.; BOYER, J. L. Cellular mechanisms of bile formation. *Gastroenterology*, **82**: 346, 1982.
- BLOCK, D. K.; HONG, C. C.; EDY, R. L.; SHOWS, T. W.; QUERTERMOUS, T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene - vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. *Genomics*, **10**: 236-242, 1991.
- BURWEN, S.J.; SCHMUCKER, D.L.; JONES, A.L. Subcellular and molecular mechanisms of bile secretion. *Int. Rev. Cytol.* **135**: 269-313, 1992.
- CABRINI, D. A.; SILVA, A.M.; CALIXTO, J. B. Mechanisms of bradykinin-induced contraction of the guinea-pig gallbladder *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1549-1556, 1995.
- CAI, W. Q.; GABELLA, G. Innervation of the gallbladder and biliary pathways in the guinea-pig. *J. Anat.*, **136**: 97-109, 1983.

- CARDOZO, A. M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; YANO, M.; FRANK JR, P.; RAE, G. A. Influence of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonist on endothelin-induced contractions of the guinea pig isolated gall bladder. *Regul. Pept.* **69**: 15-23, 1997.
- CHIOU, W. J.; SHIOSAKI, K.; TASKER, A. S.; WU-WONG, J. R. Characterization of two endothelin converting enzymes and their preference for big endothelin -1 and -2 as substrates. *Life Sci.*, **54**: 1613-1619, 1994.
- CONNAT, J.; CARRIER, N. Rat common bile duct: structure, pharmacological responsiveness, CGRP innervation and binding sites. *Gen. Comp. Endocrinology*, **100**: 197-210, 1995.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M.; YANO, M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET<sub>A</sub> receptors in the rat perfused lung. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 773-775, 1992.
- DAHLSTRAND, C.; BJORCK, S.; EDIN, R.; DAHLSTROM, A.; AHLMAN, H. Substance P in the control of extrahepatic biliary motility. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **64**: 104-105, 1986.
- DAVENPORT, A. P.; MAGUIRE, J. J. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET<sub>A</sub> receptors in humans? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 9-11, 1994.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 9797-9800, 1988.

- DENAULT, J. B.; CLAING, A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SAWAMURA, T.; KIDO, T.; MASAKI, T.; LEDUC, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.*, **362**: 276-280, 1995.
- DAVISON, J. S.; AL-HASSANI, N.; CROWE, R.; BURNSTOCK, G. The non-adrenergic inhibitory innervation of the guinea-pig gall-bladder. *Pfluegers Arch.*, **377**: 43-56, 1978.
- EGLIN, R. M.; MICHEL, A. D.; SHARIF, N. A.; SWANK, S. R.; WHITING, R. L. The pharmacological properties of the peptide endothelin. *Br. J. Pharmacol.*, **97**: 1297-1307, 1989.
- EMORI, T.; HIRATA, Y. ; MARUMO, F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cell and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett.*, **263**: 261-264, 1990.
- EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.*, **270**: 15262-15268, 1995.
- ERLINGER, S. Hepatocyte bile secretion: current views and controversies. *Hepatology*, **1**: 352, 1981.
- FELDER, C. C.; KANTERMAN, R. Y.; MA, A. L.; AXELRON, J. A transfected M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptor stimulates adenylate cyclase via phosphatidyl inositol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **264**: 20356-20362, 1989.
- FILEP, J. G.; BATTISTINI, B.; SIROIS, P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1633-1640, 1991.

- FLEMING, W. W.; WESTFALL, D. P.; DE LA LANDE, I. S.; JELLETT, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**: 339-345, 1972.
- FOLTA, A.; JOSHUA, I. G.; WEBB, R. C. Dilator actions of endothelin in coronary resistance vessels and the abdominal aorta of the guinea pig. *Life Sci.*, **45**: 2627-2635, 1989.
- FOUASSIER, L.; CHINET, T.; REBERT, B.; CARAYON, A.; BALLADUR, P.; MERGEY, M.; PAUL, A.; POUPON, R.; CAPEAU, J.; BARBU, V.; HOUSSET, C. Endothelin-1 is synthesized and inhibits cyclic adenosine monophosphate-dependent anion secretion by an autocrine/paracrine mechanism in gallbladder epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, **101**: 2881-2888, 1998.
- FUKURODA, T.; OZAKI, S.; IHARA, M.; ISHIKAWA, K.; YANO, M.; NISHIKIBE, M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contraction of the rabbit pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 336-338, 1994.
- FULGINITTI, J.; COHEN, M. M.; MORELAND, R.S. Endothelin differentially affects rat gastric longitudinal and circular smooth muscle. *J. Pharmacol. Expr. Ther.*, **265**: 1413-1420, 1993.
- GOCER, F.; YARIS, E.; TUNCER, M. The effects of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> alpha on rhythmic contractions of sphincter of Oddi. *Gen. Pharmacol.*, **26**: 1397-1401, 1995.
- GOTO, K.; HAMA, H.; KASUYA, Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**: 261-290, 1996.

- GRASSI-KASSISSE, D. M.; ANTUNES, E.; WITHRINGTON, P. G.; DE NUCCI, G. Modulation by endogenous prostanoids of the vasoconstrictor activity of endothelin-1 in the canine isolated, perfused spleen. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 675-680, 1994.
- GRAY, G.A.; WEEB, D.J. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* **72**: 109-148, 1996.
- GRATTON, J. P.; RAE, G.A.; CLAING, A.; TÉLEMAQUE, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Different pressor and bronchoconstrictor properties of human big-endothelin-1, 2 (1-38) and 3 in ketamine/xylazine-anaesthetized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 000-007, 1995.
- GUIMARÃES, C. L.; RAE, G. A. Dual effects of endothelin-1, -2 and -3 on guinea pig field-stimulated ileum: possible mediation by two receptors coupled to pertussis toxin-insensitive mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**: 1253-1259, 1992.
- HARADA, T.; KATSURAGI, T.; FURUKAWA, T. Release of acetylcholine mediated by cholecystokinin receptor from the guinea pig sphincter of Oddi. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**: 554-558, 1986.
- HILAL-DANDAN, R.; URASAWA, K.; BRUNTON, L. L. Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 10620-10640, 1992.
- HIROSE, T.; ITO, Y. Excitatory and inhibitory responses of Oddi's sphincter in guinea pigs. *Am. J. Physiol.*, **260**: G615-G624, 1991.
- HONG, S. M.; KANG, G. H.; LEE, H. Y.; RO, J. Y. Smooth muscle distribution in the extrahepatic bile duct – Histological and immunohistochemical studies of 122 cases. *Am. J. Surg. Pathol.*, **24**: 660-667, 2000.

HOSODA, K.; HAMMER, R. E.; RICHARDSON, J. A.; BAYNASSH, A. G.; CHEUNG, J.; GIAID, A.; YANAGISAWA, M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, **79**: 1267-1276, 1994.

HOSODA, K.; NAKAO, K.; ARAI, H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*, **287**: 23-26, 1991.

HOUSSEAU, A.; FOURNIER, A.; SIROIS, P. Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet-activating factor. *Br. J. Pharmacol.*, **74**: 797-804, 1991.

HOUSSET, C.; CARAYON, A.; HOUSSET, B.; LEGENDRE, C.; HANNOUN, L.; POUPON, R. Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. *Lab. Invest.*, **69**: 750-755, 1993.

HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.*, **26**: 223-242, 1992.

IGNARRO, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.*, **65**: 1-21, 1989.

IHARA, M.; NOGUCHI, K.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; TSUCHIDA, S.; KIMURA, S.; FUKAMI, T.; ISHIKAWA, K.; NISHIKIBE, M.; YANO, M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonist selective for the ET<sub>A</sub> receptor. *Life Sci.*, **50**: 247-255, 1992.

INAGAKI, H.; BISHOP, A. E.; YURA, J.; POLAK, J. M. Localization of endothelin and its binding sites to the nervous system of the human colon. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**: S455-S457, 1991.

- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 2863-2867, 1989.
- ISALES, C. M.; NATHANSON, M. H.; BRUCK, R. Endothelin-1 induces cholestasis which is mediated by an increase in portal pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 1244-1251, 1993.
- IVY, A. C.; OLDBERG, E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.* **86**: 599-613, 1928.
- JACOBSSON, B. Determination of pressure in the common bile duct at and after operation. *Acta. Chir. Scand.* **114**: 483-488, 1957.
- KAMIMURA, Y.; SAWADA, N.; AOKI, M.; MORI, M. Endothelin-1 induces contraction of bile canaliculi in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 817-822, 1993.
- KARNE, S.; JAYAWICKREME, C. K.; LERNER, M. R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.*, **268**: 19126-19133, 1993.
- KENNEDY, A. L.; MAWE, G. M. Duodenal sensory neurons project to sphincter of Oddi ganglia in guinea pig. *J. Neurosci.*, **18**: 8065-8073, 1998.
- KOCHVA, E.; BDOLAH, A.; WOLLBERG, Z. Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function. *Toxicon.*, **31**: 541-568, 1993.
- KURIHARA, Y.; KURIHARA, H.; SUZUKI, H.; KODAMA, T.; MAEMURA, K.; NAGAI, R.; ODA, H.; KUWAKI, T.; CAO, W. -H.; KAMADA, N.; JISHAGE, K.; OUCHI, Y.; AZUMA, S.; TOYODA, Y.; ISHIKAWA, T.; KUMADA, M.;



- YAZAKI, Y. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, **368**: 703-710, 1994.
- KRAUS, T.; KLAR, E.; MEHRABI, A.; BLEYL, J.; AULMANN, M.; OSSWALD, B. R.; HERFARTH, C.; OTTO, G. Endothelin 1/2 and big-endothelin concentration in bile samples during the early postoperative period after liver transplantation. *Transp. Proc.*, **27**: 1258-1260, 1995.
- LADOUX, A.; FRELIN, C. Endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**: 169-173, 1991.
- LEHMAN, G. A.; SHERMAN, S. Sphincter of Oddi dysfunction. *Int. J. Pancreatol.* **20**: 11-25, 1996.
- LEMBECK, F.; DECRINIS, M.; PERTL, C.; AMANN, R.; DONNERER, J. Effects of endothelin on the cardiovascular system and on smooth muscle preparations in different species. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **340**: 744-751, 1989.
- LIN, T. M. Action of gastrointestinal hormones and related peptides on the motor function of the biliary tract. *Gastroenterology*, **69**: 1006-1022, 1975.
- LONOVICS, J.; GOMEZ, G. The role of gastrointestinal hormones and neuropeptides in the regulation of gallbladder motility. Cellular basis of peptide action. *Regul. Pept.*, **3**: 65-71, 1991.
- LONOVICS, J.; MADÁCSY, L.; SZEPE, A.; SZILVÁSSY, Z.; VELOSY, B. E. VARRÓ, V. Humoral mechanisms and clinical aspects of biliary tract motility. *Scand J. Gastroenterol.* **228**: 73-89, 1998.
- LONOVICS, J.; NEMETH, J.; VARRÓ, V.; GREELEY Jr, G. H.; THOMPSON, J. C. Humoral mechanisms and gallbladder motility. In: *Gastrointestinal*

*endocrinology. Receptors and post-receptor mechanisms.* Thompson JC Ed.), New York, Academic Press, pp. 491-504, 1990.

LONOVICS, J.; VELŐSY, B.; LÉNÁRT, S.; GREELEY Jr, G.H.; THOMPSON, J. Species differences in Oddi-sphincter responses to brain-gut peptides. *Dig. Dis. Sci.* **35**: 6, 1990.

MASAKI, T., YANAGISAWA, M., GOTO, K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med. Res. Ver.*, **12**: 391-421, 1992.

MASAKI, T.; VANE, J. R.; VANHOUTTE, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**: 137-142, 1994.

MASAKI, T.; MIWA, S.; SAWAMURA, T.; NINOMIYA, H.; OKAMOTO, Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur. J. Pharmacol.*, **375**: 133-138, 1999.

MATSUMOTO, H., SUZUKI, N., ONDA, H., FUJINO, M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 74-80, 1989.

MATTERA, G. G.; EGLEZOS, A.; RENZETTI, A. R.; MIZRAHI, J. Comparison of the cardiovascular and neural activity of endothelin-1, -2, -3, and respective proendothelins. Effects of phosphoramidon and thiorfan. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 331-337, 1993.

MILLER, V. M.; KOMORI, K.; BURNETT JR. J. C.; VANHOUTTE, P. M. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am. J. Physiol.*, **257**: H1127-131, 1989.

- MINKER, E.; VARKONYI, T.; TAMASKOVITS, E. The pharmacological reactivity of an isolated circular smooth muscle strip of the rabbit common bile duct. *Acta Pharm. Hung.*, **63**: 163-175, 1993.
- MIYAUSCHI, T.; MASAKI, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.*, **61**:391-415, 1999.
- MOUMMI, C.; GULLIKSON, G. W.; GAGINELLA, T. S. Effect of endothelin-1 on guinea pig gallbladder smooth muscle *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**: 549-553, 1992b.
- MOUMMI, C.; XIE, Y.; KACHUR, J. F.; GAGINELLA, T. S. Endothelin-1 stimulates contraction and ion transport in the rat colon: Different mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**: 409-414, 1992a.
- MYERS, S. I.; BARTULA, L. Human cholecystitis is associated with increased gallbladder prostaglandin I<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *Hepatology*, **16**: 1176-1179, 1992.
- MYERS, S. I.; EVANS, C. T.; INMAN, L.; DEMIAN, S.; BARTULA, L.; KALLEY-TAYLOR, B.; RIVA, A. Acute cholecystitis potentiates bradykinin stimulated fibroblast prostanoid release in the rabbit. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **95**: 129-138, 1993.
- NAKAHARA, S.; EMOTO, N.; MATSUO, M. Isolation of an alternative sliced variant of bovine ECE-2. Abstract Book of the Sixth International Conference on Endothelin, Montreal, 03, 1999.
- NAKANO, A.; KISHI, F.; MINAMI, K.; WAKABAYASHI, H.; NAKAYA, Y.; KIDO, H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J. Immunol.*, **15**:159:1987-92, 1997.

- NAKATA, K.; KURAHASHI, K. Effects of C-terminal octapeptide of cholecystokinin and prostaglandins on adrenergic functions in the guinea-pig gallbladder and sphincter of Oddi. *Jpn. J. Pharmacol.*, **31**: 77-83, 1981.
- OCCHIPINTI, M. Prostaglandins and gastrointestinal function. *Adv. Pediatr.*, **25**: 205-211, 1978.
- OGAWA, Y.; NAKAO, K.; HIROSH-ARAI. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 248-255, 1991.
- OPGENORTH, T., KIMURA, S., WU-WONG, J.R. Characterization of endothelin-converting enzymes. *Meth. Neurosci.* **23**: 251-265, 1995.
- PADBURY, R. T.; FURNESS, J. B.; BAKER, R. A.; TOULI, J.; MESSENGER, J. P. Projections of nerve cells from the duodenum to the sphincter of oddi and gallblader of the Australian opossum. *Gastroenterology*, **104**: 130-136, 1993.
- PAULETZKI, J. G.; SHARKEY, K. A.; DAVISON, J. S.; BOMZON, A.; SHAFFER, E. A. Involvement of L-arginine-nitric-oxide pathways in neural relaxation of the sphincter of Oddi. *Eur. J. Pharmacol.*, **232**: 263-270, 1993.
- PFAFFENDORF, M.; MOORMANN, M.; SPONHOLZ, F. Comparison of various spasmolytic drugs on guinea-pig isolated common bile duct. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.* **344**: 114-118, 1991.
- PINZANI, M.; MILANI, S.; DE FRANCO, R.; GRAPPONE, C.; CALIGIURI, A. GENTILINI, A.; TOSTI-GUERRA, C.; MAGGI, M.; FAILLI, P.; RUOCCO, C.; GENTILINI, P. Endothelin is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, **110**: 534-548, 1996.

- POUSSET, F. Endothelins In chronic cardiac insufficiency. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, **91**: 23-26, 1998.
- RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. *Regul. Pept.*, **55**: 1-46, 1995.
- RAE, G. A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13 (suppl. 5)**: S89-S92, 1989.
- RESINK, T. J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F. R. Endothelin stimulates phospholipase C in culture of vascular muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**: 1360-1368, 1988.
- REYNOLDS, E.; MOK, L.; KUROSAWA, S. Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 868-873, 1989.
- RYAN, J. P. Motility of the gallbladder and biliary tree. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson LR (Ed.), New York, Raven Press, pp. 695-721, 1987.
- SAIDA, K.; MITSUI, Y.; ISHIDA, P. A novel peptide vasoactive intestinal contractor of new endothelin peptide family. *J. Biol. Chem.*, **264**: 1413-1416, 1989.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; TAUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci.*, **13**: 103-108, 1992

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**: 732-735, 1990.

SHERLOCK, S. The syndrome of disappearing intrahepatic bile ducts. *Lancet*. **2**: 493-496, 1987.

SHERLOCK, S. Primary biliary cirrhosis: clarifying the issues. *Am. J. Med.* **96**: S27-S33, 1994.

SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M.; TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18275-18278, 1994.

SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M.; IKEDA, M.; TANZAWA, K. Identification and characterization of two isoforms of endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.*, **371**: 140-144, 1995.

SIMONSON, M. S.; OSANAI, T.; DUNN, M. J. Endothelin isopeptides evoke  $Ca^{2+}$  signalling and oscillations cytosolic free  $[Ca^{2+}]$  in human mesangial cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **1055**: 63-68, 1990.

SIMONSON, M. S.; WANN, S.; MENÉ, P.; DUBYAK, G. R.; KESTER, M.; NAKAZATO, Y.; SEDOR, J. R.; DUNN, M. J. Endothelin stimulates phospholipase C,  $Na^+/H^+$  exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **83**: 708-712, 1989.

SLIVKA, A.; CHUTTANI, R.; CARR-LOCKE, D. L.; KOBZIK, L.; BREDET, D. S.; LOSCALZO, J. Inhibition of sphincter of Oddi function by the nitric oxide carrier S-nitroso-N-acetylcysteine in rabbits and humans. *J. Clin. Invest.*, **94**: 1792-1798, 1994.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical methods*, Ames, Iowa State University Press, 1967.

SZILVÁSSY, Z.; NAGY, I.; SZILVÁSSY, J.; JAKAB, I.; CSATI, S.; LONOVICS, J. Impaired nitrenergic relaxation of the sphincter of Oddi of hyperlipidaemic rabbits. *Eur. J. Pharmacol.*, **301**: R17-18, 1996.

SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmacol. Ther.*, **54**: 129-149, 1992.

SOKOLOVSKY, M. Functional coupling between endothelin receptors and multiple G-protein in rat heart myocytes. *Receptors channels*. **1**: 295-304, 1993.

SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **15**: 561-571, 1995.

STRAZZABOSCO, M.; SPIRLI, C.; OKOLICSANYI, L. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**: 244-253, 2000.

STRAZZABOSCO, M. Transport systems in cholangiocytes: their role in bile formation and cholestasis. *Yale J. Biol. Med.* **70**: 427-434, 1997.

SUNAKO, M.; KAWAHARA, Y.; HIRATA, K.; TSUDA, T.; YOKOYAMA, M.; FUKUZAKI, H.; TAKAY, Y. Mass analysis of 1,2-diacylglycerol in cultured rabbit vascular smooth muscle cells – comparison of stimulation by angiotensin-II and endothelin. *Hypertension*, **15**: 84-88, 1990.

- SUZUKI, H.; FUKUSHI, Y.; WAKUI, M. D-600 sensitive and insensitive spontaneous contraction in the guinea pig hepatic duct. *Tohoku J. Exp. Med.*, **156**: 13-21, 1988.
- TAKAHASHI, T.; KUSUNOKI, M.; KANTOH, M.; YAMAMURA, T.; UTSONOMIYA, J. Effects of cholecystokinin octapeptide on contractile motility of guinea pig common bile duct. *Am. J. Physiol.*, **254**: G819-G823, 1988.
- TAKAHASHI, K.; JONES, P.M.; KANSE, S.M.; LAM, H.-C.; SPOKES, R. A.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Endothelin in gastrointestinal tract. Presence of endothelin like immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology*, **99**: 1660-1667, 1990.
- TAKAI, M.; UMEMURA, I.; YAMASAKI, K.; WATAKABE, T.; FUJITANI, Y.; ODA, K.; URADE, Y.; INUI, T.; YAMAMURA, T.; OKADA, T. A potent and specific agonist, Suc-[Glu<sup>9</sup>, ALA<sup>11,15</sup>]-endothelin-1 (8-21), IRL 1620, for the ET<sub>B</sub> receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 953-959, 1992.
- TALMAGE, E. K.; HILLSLEY, K.; KENNEDY, A. L.; MAWE, G. M. Identification of the cholinergic neurons in guinea-pig sphincter of Oddi ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* **64**: 12-18, 1997.
- TANOBE, Y.; OHAMURA, T.; FUJIMURA, M.; TODA, N. Functional role and histological demonstration of nitric-oxide-mediated inhibitory nerves in dog sphincter of Oddi. *Neurogastroenterol. Motil.*, **7**: 219-227, 1995.
- THUNE, A.; SACCONI, G. T.; SCICCHITANO, J. P.; TOOULI, J. Distension of the gall bladder inhibits sphincter of Oddi motility in humans. *Gut*. **32**: 690-693, 1991.



- TOKUNAGA, Y.; COX, K. L.; ITASAKA, H.; CONCEPCION, W.; NAKAZATO, P.; ESQUIVEL, C. O. Characterization of cholecystokinin receptors on the human sphincter of Oddi. *Surgery*, **114**: 942-950, 1993.
- TOOULI, J. Biliary tract motor dysfunction. In: *Baillière's Clinical Gastroenterology*, Dent, J. (Ed.), London, Baillière Tindall, pp. 409-430, 1991.
- TOOULI, J.; DODDS, W. J.; HONDA, R.; SARMA, S.; HOGAN, W. J. M.; KOMAROWSKI, R. A. Motor function of the opossum sphincter of Oddi. *J. Clin. Invest.*, **71**: 208-220, 1983.
- TURNER, A. J.; BARNES, K.; SCHWEIZER, A.; VALDENAIRE, O. Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where?. *Trend. Pharmacol Sci.*, **19**: 483-486, 1998.
- TURNER, A. J.; MURPHY, L. J. Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, **51**: 91-102, 1996.
- USUNE, S.; KATSURAGI, T.; FURUKUWA, T. Involvement of K<sup>+</sup> channel opening in endothelin-1 induced suppression of spontaneous contractions in the guinea pig taenia coli. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**: 1908-1913, 1991.
- VALDENAIRE, O. LEPAILLEUR-ENOUF, D.; EGIDY, G.; THOUARD, A.; BARRET, A.; VRANCKX, R.; TOUGARD, C.; MICHEL, J. B. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur. J. Biochem.*, **264**:341-9, 1999.
- VARRÓ, V.M.; LONOVICS, J. Sphincter of Oddi dyskinesia: pathology and clinical aspects. In: *Topics in digestive disease 2. Cortina internacional Verona*. Bianchi P. (Ed.), New York, Raven Press, pp. 357-83, 1988.

- VIGNE, P.; LADOUX, A.; FRELIN, C. Endothelins activate  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  exchange in brain capillary endothelial cells via a high affinity endothelin-3 receptor that is not coupled to phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **226**: 5925-5928, 1991.
- VONGALIS, F.; BYWATER, R. A.; TAYLOR, G. S. Nerve-mediated contractile and electrical activity of the guinea-pig choledocho-duodenal junction. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **29**: 19-28, 1989.
- VOROB'EV, L. P.; SALOVA, L. M. Dynamics of biliary prostaglandin secretion in patients with dyskinesia of the biliary tracts. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* **4**: 37-38, 1995.
- WARNER, T. D.; ALLCOCK, G. H.; CORDER, R.; VANE, J. R. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 777-782, 1993.
- WEBB, J. D.; MONGE, J. C.; RABELINK, T. J.; YANAGISAWA, M. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **19**: 5-8, 1998.
- WEBB, D. J. Endothelin: from molecule to man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **44**: 9-20, 1997.
- WELLS, D. G.; TALMAGE, E. K.; MAWE, G. M. Immunohistochemical identification of neurons in ganglia of the guinea pig sphincter of Oddi. *J. Comp. Neurol.*, **352**: 106-116, 1995.
- WELLS, D. G.; MAWE, G. M. Sympathetic input to ganglia of the guinea pig sphincter of Oddi, *Am. J. Physiol.* **266**: G1162-G1169, 1994.

- WIENER, J.; FAGAN, C. L.; LILJA, P.; WATSON, L. C. THOMPSON, J. C. Release of cholecystokinln in man. Correlation of blood levels with gallbladder contraction. *Ann. Surg.* **194**: 321-325, 1981.
- WIKLUND, N. P.; OHLÉN, A.; WIKLUND, C. U.; CEDERQVIST, B.; HEDQVIST, P.; GUSTAFSSON, L. E. Neuromuscular actions of endothelin on smooth, cardiac and skeletal muscle from gulnea pig, rat and rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, **137**: 399-407, 1989.
- WILEY, J. W.; O'DORIOSO, T. M.; OWYANG, C. Vasoactive intestinal polypeptide mediates cholecystokinin-Induced relaxation of the sphincter of Oddi. *J. Clin. Invest.*, **81**: 1920-1924, 1988.
- WILLIAMS J. R., D. L.; JONES, K. L.; PETTIBONE, D. J.; LIS, E. V.; CLINESCHIMIDT, B. V. Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 556-561, 1991.
- WYPIJ, D. M.; NICHOLS, J. S.; NOVAK, P. J.; STACY, D. L.; BERMAN, J.; WISEMAN, J. S. Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol.*, **43**: 845-53,1992.
- WOOD, J. R.; SVANVIK, J.. Gallbladder water and electrolyte transport and its regulation. *Gut*, **24**: 579, 1983.
- XU, D.; EMOTO, N.; GIAID, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DEWIT, D.; YANAGISAWA, M. ECE-1: a membrana-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell*, **78**: 473-485, 1994.

YAMASATO, T.; NAKAYAMA, S. Effects of neurotensin on the motility of the isolated gallbladder, bile duct and ampulla in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, **148**: 101-106, 1988.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by the endothelial cells. *Nature*, **332**: 441-445, 1988.

YASAR, U.; ERDEM, S. R.; TUNCER, M. Cyclosporine A preparations and their vehicles induce contraction of the guinea pig gallbladder in vitro: the role of cicloxygenase metabolites. *Pharmacology*, **58**: 309-318, 1999.