

CLÁUDIO LAURENTINO GUIMARÃES

**EFEITOS DAS ENDOTELINAS NO ÍLEO ISOLADO DE COBAIA SUBMETIDO
À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE CAMPO**

FLORIANÓPOLIS

1994

CLÁUDIO LAURENTINO GUIMARÃES

**EFEITOS DAS ENDOTELINAS NO ÍLEO ISOLADO DE COBAIA SUBMETIDO
À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE CAMPO**

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



**"EFEITOS DAS ENDOTELINAS NO ÍLEO ISOLADO DE COBAIA
SUBMETIDO A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE CAMPO"**

POR

CLÁUDIO LAURENTINO GUIMARÃES

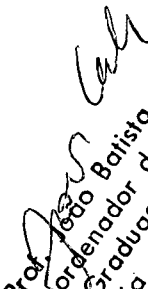
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis, abril de 1994.


Prof. João Batista Calixto
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia - CCB/UFSC

DEDICATÓRIA

**Dedico esta dissertação aos meus pais que empenham-se
exaustivamente à educação de seus filhos e, de modo
especial, ao querido amigo Daniel Millen Neto (*in
memoriam*).**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela compreensão e sensibilidade as dificuldades que enfrentei durante os meus dois anos como estagiário no Depto. de Farmacologia e como aluno de pós-graduação.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, pelo apoio e, de forma especial, ao Dr. João B. Calixto, Dr^a Yara S. Medeiros e Dr^a Thereza C.M.L. Nogueira pelo constante incentivo à pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia - UFSC, pelo carinho e auxílio, de modo especial a Rosane Ostrosky, Elizabete Ganzer Ramos, Elza Athanázio Bernardini Ramos e ao ex-funcionário Amaro José da Silva.

Aos colegas da Pós-Graduação pela troca de conhecimentos.

Ao apoio oferecido pelos Professores Ana Cechet, Egon Schramm, Maurici Nascimento, Luís Carlos Lins e a funcionária Rosemeri Costa, da Universidade Regional de Blumenau e pelo carinho dos meus seguintes alunos: Leandro Ferreira, Richard Luzzi, Leandro Viecili, Lauro Bitencourt, Fabio Sant'Ana, Paulo de Tarso Fontes Neto, Renato Ernani da Silva e Nair T. Vieira (*in memoriam*).

À CAPES, pelo apoio financeiro.

As teorias nunca devem ser ensinadas como dogmas. Quando se crê exageradamente nelas, transmite-se uma idéia contrária à que se tem. Sobrecarrega-se e subjuga-se o espírito, roubando-lhe a liberdade, sufocando-lhe a originalidade e inculcando-lhe o gosto dos sistemas.

Claude Bernard

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 - Animais	18
3.2 - Montagem das preparações	18
3.3 - Estimulação elétrica de campo	19
3.4 - Curvas concentração-efeito às endotelinas e ao Bay K 8644	19
3.5 - Caracterização dos receptores envolvidos nos efeitos das endotelinas	20
3.6 - Mecanismos de ação da endotelina-1 no fêo	20
3.7 - Drogas, sais e soluções	22
3.8 - Apresentação dos resultados e análise estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1 - Efeitos da estimulação elétrica	24
4.2 - Efeitos da endotelina-1, endotelina-3 e sarafotoxina S6c	24
4.3 - Influência do BQ 123 nos efeitos da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c	32
4.4 - Taquifilaxia à endotelina-1 e à sarafotoxina S6c	32
4.5 - Mecanismos de ação da endotelina-1 no fêo	37

5. DISCUSSÃO	47
6. RESUMO E CONCLUSÕES	63
SUMMARY AND CONCLUSIONS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1** - Registros isométricos típicos dos efeitos bifásicos da endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3 no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo 25
- FIGURA 2** - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos depressores da endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3 nas respostas neurogênicas do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica 29
- FIGURA 3** - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos contráteis da endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3 no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica. 30
- FIGURA 4** - Comparação dos efeitos da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica 31
- FIGURA 5** - Comparação dos efeitos inibitórios da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c nas contrações neurogênicas do íleo isolado de cobaia estimulado eletricamente, na ausência ou na presença de BQ-123 33
- FIGURA 6** - Comparação dos efeitos contráteis da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica na ausência ou na presença de 30 ou 100 nM de BQ-123 34
- FIGURA 7** - Inibição das respostas neurogênicas do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica induzida por duas exposições sucessivas da preparação à endotelina-1 e/ou sarafotoxina S6c 35
- FIGURA 8** - Contração do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica, induzida por duas exposições sucessivas da preparação à endotelina-1 e/ou sarafotoxina S6c 36

FIGURA 9 - Comparação dos efeitos da endotelina-1 e do Bay K 8644 sobre as respostas neurogênicas e sobre o tônus do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação	38
FIGURA 10 - Registros isométricos típicos dos efeitos da nicardipina sobre a resposta bifásica do íleo isolado de cobaia à endotelina-1	41
FIGURA 11 - Registros isométricos típicos mostrando a influência da cromacalina e da glibenclamida na resposta bifásica induzida pela endotelina-1 no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica	42
FIGURA 12 - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos da endotelina-1 em preparações de íleo isolado de cobaia controle ou tratada com toxina de <i>Bordetella pertussis</i>	45
FIGURA 13 - Curvas concentração-efeito médias para o efeito depressor da morfina sobre as respostas neurogênicas do íleo isolado de cobaia controle ou tratado, com toxina de <i>Bordetella pertussis</i>	46
TABELA 1 - Efeitos da endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3, sarofotoxina S6c e Bay K 8644 no íleo de cobaia	28
TABELA 2 - Influência da pré-incubação de diversas drogas nos efeitos da endotelina-1 no íleo de cobaia	39
TABELA 3 - Influência da endotelina-1 nas contrações induzidas por acetilcolina, histamina, bradicinina e substância P no íleo de cobaia	43

1 - INTRODUÇÃO

Além de atuarem como barreira entre o sangue e a musculatura lisa vascular subjacente e de estarem envolvidas na deflagração dos mecanismos de coagulação sangüínea (Esmon, 1987), as células endoteliais são responsáveis pela síntese e degradação de várias substâncias sangüíneas biologicamente ativas presentes no plasma (Vane *et al.*, 1987; Jaffe, 1987). Algumas substâncias produzidas pelo endotélio são importantes moduladores do tônus vascular, como a prostaciclina (Moncada *et al.*, 1976) e o "fator relaxante derivado do endotélio" (Furchgott & Zawadski, 1980), identificado mais tarde como sendo o óxido nítrico (Palmer *et al.*, 1987). A prostaciclina, que é formada a partir do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase, relaxa a musculatura lisa vascular e inibe a agregação plaquetária por ativação da adenilato ciclase e formação de AMPc. Por sua vez, o óxido nítrico, que é sintetizado a partir da L-arginina por ação de uma óxido nítrico-sintetase, também causa esses mesmos efeitos da prostaciclina por ativação da guanilato ciclase e formação de GMPc. A produção de ambas as substâncias pelo endotélio pode ser estimulada por diversos agentes incluindo acetilcolina, histamina, bradicinina, trombina, ácido araquidônico, várias citocinas, hipóxia ou estiramento (para uma revisão ver Marin & Sánchez-Ferrer, 1990).

As células endoteliais sintetizam ainda pelo menos dois compostos vasoconstritores. Um deles é um prostanóide, possivelmente a tromboxano A₂, pois sua síntese é bloqueada por inibidores da cicloxigenase (Masaki *et al.*, 1992). Entretanto, O'Brien & McMurtry (1984) detectaram um "fator vasoconstritor dependente do endotélio" no sobrenadante de cultura de células endoteliais arteriais que contraía de forma persistente a artéria pulmonar de bovinos. O efeito dependia de cálcio extracelular,

mas não era afetado por antagonistas de receptores para vasoconstritores conhecidos ou por inibidores da cicloxigenase ou lipoxigenase. Porém, a atividade do fator foi atenuada pela tripsina, sugerindo que tivesse uma estrutura peptídica (Hickey *et al.*, 1985; Gillespie *et al.*, 1986).

De fato, Yanagisawa *et al.* (1988) isolaram, do sobrenadante de cultura de células endoteliais de aorta de suíno, um peptídeo com potente atividade constritora em diversos vasos isolados e hipertensiva em ratos anestesiados, ao qual chamaram de **endotelina**. A contração prolongada induzida pela endotelina em tiras de artéria coronária suína não foi bloqueada por fentolamina, difenidramina, metisergida, indometacina, ácido nordiidroguaiarético ou por lavagens sucessivas da preparação, mas foi revertida pelo isoproterenol. A seqüenciação de aminoácidos da endotelina revelou a presença de 21 resíduos e a presença de duas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína (Cys¹-Cys¹⁵ e Cys³-Cys¹¹).

Subseqüentemente, Inoue *et al.* (1989) demonstraram que o genoma de mamíferos contém 3 genes codificando 3 isopeptídeos distintos da endotelina. Assim, a endotelina foi renomeada endotelina-1 e os 2 peptídeos adicionais foram chamados de endotelina-2 e endotelina-3. Apesar da grande homologia estrutural entre as 3 endotelinas e da conservação estrutural de cada uma em diferentes espécies, uma quarta endotelina encontrada no intestino de camundongos chamada "peptídeo intestinal vasoconstritor" (VIC) ou endotelina-β (Saida *et al.*, 1989), acabou revelando-se como a variante da endotelina-2 encontrada em camundongos e ratos (Bloch *et al.*, 1991). A família das endotelinas apresenta, ainda, grande homologia estrutural (50-70%) com as sarafotoxinas S6a, S6b, S6c, e S6d, peptídeos cardiotoxicos presentes no veneno da serpente *Atractaspis engaddensis* (Kloog *et al.*, 1988; Bdolah *et al.*, 1989).

A análise estrutural da endotelina-1 por ressonância magnética revela uma conformação helicoidal entre os aminoácidos 1 a 15, tornando a porção N-terminal hidrofílica, enquanto o segmento 16-21 apresenta-se estendido, conferindo hidrofobicidade à porção C-terminal (Nakajima *et al.*, 1989). Tanto as pontes dissulfeto quanto a região hidrofóbica são essenciais à atividade biológica do peptídeo (para revisões ver Masaki *et al.*, 1992 e Huggins *et al.*, 1993).

A síntese e liberação de endotelina-1 por células endoteliais é estimulada por diversos agentes, incluindo trombina (Schini *et al.*, 1989), adrenalina (Yanagisawa *et al.*, 1988a,b), o ionóforo de cálcio A 23187 (Yanagisawa *et al.*, 1988), 12-tetradecanoilforbol-13-acetato (Inoue *et al.*, 1989), fator de crescimento tumoral- β (Kurihara *et al.*, 1989), interleucina-1 (Casey *et al.*, 1991; Sugiura *et al.*, 1989), interleucina-2 (Miyamori *et al.*, 1991), interferon- γ (Kanase *et al.*, 1991), endotoxina (Sugiura *et al.*, 1989), arginina-vasopressina (Bakris *et al.*, 1991) e oxi-hemoglobina (Cocks *et al.*, 1991). A liberação de endotelina-1 parece envolver síntese *de novo* do peptídeo a partir da expressão do gene codificando a pré-pró-endotelina-1, já que as células endoteliais não contêm depósitos vesiculares de peptídeo pré-formado (para uma revisão ver Battistini *et al.*, 1993). Além disso, embora o endotélio vascular sintetize apenas a endotelina-1, vários tecidos expressam o RNAm para a síntese das três isoformas de endotelina. Os mecanismos que regulam a síntese das demais isoformas ainda não está bem esclarecido.

A pré-pró-endotelina-1 é clivada entre os resíduos Lys⁵²-Arg⁵³ e Arg⁹¹-Arg⁹² por endopeptidases específicas para resíduos básicos, dando origem à big-endotelina-1. A big-endotelina-1 suína possui 39 aminoácidos, enquanto as isoformas humanas da big-endotelina-1 e big-endotelina-2 possuem 38 e 37 aminoácidos, respectivamente, ao contrário da big-endotelina-3 que possui 41. A big-endotelina-1 e big-endotelina-2 são

clivadas entre Trp²¹-Val²² por uma "enzima conversora de endotelina", enquanto que a big-endotelina-3 é clivada entre Trp²¹-Ile²² (Yanagisawa *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989). A ação enzimática da enzima conversora de endotelina é bloqueada por fosforamidon, tiorfan e 1,10-fenantrolina (Sawamura *et al.*, 1991; McMahon *et al.*, 1991; Fukuroda *et al.*, 1990; Matsumura *et al.*, 1990), mas não por aspartato-, serina- ou cisteína-proteases (Rubanyi & Botelho, 1991). A enzima conversora de endotelina sensível ao fosforamidon aparenta ser mais seletiva à big-endotelina-1 do que à big-endotelina-3 (Opgenorth *et al.*, 1992; Télémaque & D'Orléans-Juste, 1991; Warner *et al.*, 1992).

Apesar do nome dado à família, as endotelinas são sintetizadas por diversos tipos de células, além do endotélio. Esses peptídeos ocorrem na musculatura lisa vascular e não-vascular, fibroblastos, leucócitos, células epiteliais dos tratos respiratório, gastrintestinal, urogenital e renal, hipófise e várias áreas do sistema nervoso central (para revisões ver Masaki *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1992). A formação de endotelina-1 é particularmente pronunciada em células tumorais de pulmão, cólon, fígado e cérvix humanos (Suzuki *et al.*, 1989). De Nucci *et al.* (1988) verificaram que mais de 60% da endotelina-1 circulante é removida pela circulação pulmonar de rato ou cobaia em uma única passagem, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Desta forma, a endotelina-1 de origem endotelial parece constituir mais um mediador de atuação parácrina local do que um hormônio ou fator circulante. Possivelmente, as endotelinas produzidas por outros tipos de células também exercem funções locais (Simonson, 1993).

Sítios ligantes de alta afinidade para endotelina-1 foram demonstrados, através de técnicas autoradiográficas ou de "binding", em diversos tecidos ou órgãos, incluindo o coração, rim, pulmão, vasos sangüíneos, baço, glândula adrenal, olho, trato gastrintestinal e cérebro, entre outros (Koseki *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1989; Masaki *et al.*, 1992;

Haynes & Webb, 1993). A associação das endotelinas a tais sítios parece ser muito específica, pois a ligação de [¹²⁵I]endotelina-1 a fragmentos das membranas miocárdicas de rato é inibida por endotelina-1 ou sarafotoxina S6b, mas não por várias outras drogas (Bay K 8644, nicardipina, diltiazem, prenilamina, NiCl₂, *w*-conotoxina, amilorida, prazosin, isoprenalina, angiotensina II, [Sar¹-Ala⁸]-angiotensina II, vasopressina ou ergotamina) (Gu *et al.*, 1989).

A mera existência de três isoformas de endotelina sugere a existência de múltiplos tipos de receptores para esses peptídeos. Diferenças nas respostas funcionais e resultados obtidos através dos estudos de radioligantes evidenciaram a existência de pelo menos três receptores específicos para as endotelinas (para revisão ver Huggins *et al.*, 1993). Dois desses receptores já foram clonados. O primeiro deles, o receptor ET_A, contém 427 aminoácidos e apresenta afinidade muito maior à endotelina-1 e à endotelina-2, do que à endotelina-3 (Arai *et al.*, 1990; Hosada *et al.*, 1991; Cyr *et al.*, 1991). O RNAm para o receptor ET_A expressa-se em vários tecidos como a aorta, coração, pulmão, intestino e cérebro (Sakurai *et al.*, 1992), mas não em células endoteliais (Hosada *et al.*, 1991). O segundo receptor clonado é o ET_B, que apresenta afinidades semelhantes às três endotelinas. O receptor ET_B humano apresenta 442 aminoácidos e 55% de homologia com o receptor ET_A (Sakurai *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1991; Ogawa *et al.*, 1991), e o RNAm que o codifica expressa-se largamente no sistema nervoso central (córtex cerebral e cerebelo) e com menor intensidade no pulmão, rim, glândula adrenal, intestino e células endoteliais (Ogawa *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 1992). Há evidências funcionais de um terceiro tipo de receptor, o receptor ET_C, que apresenta afinidade maior pela endotelina-3 que pela endotelina-1 e pode mediar efeitos desses peptídeos em neurônios, células da pituitária e circulação hepática (Samson *et al.*, 1990; Stojilkovic & Catt, 1992; Masaki *et al.*, 1992). Os receptores ET_A e ET_B pertencem à superfamília de receptores da

rodopsina, apresentando sete domínios hidrofóbicos transmembrana, uma longa cadeia peptídica aminoterminal extracelular e são acoplados às proteínas G (Sakamoto *et al.*, 1993).

Os efeitos mediados por receptores ET_A e ET_B também podem ser diferenciados através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos para cada um deles. Os primeiros a fazer uso desse tipo de abordagem foram Maggi *et al.* (1989a), que verificaram que o hexapeptídeo C-terminal (16-21) da endotelina-1, um agonista seletivo de receptores ET_B, é um agonista total no brônquio isolado de cobaia, mas não contrai a aorta de rato. A endotelina-1 é ativa em ambas as preparações. Outros agonistas seletivos de receptores ET_B incluem o IRL 1620, a sarafotoxina S6c, a [Ala^{1,3,11,15}]-endotelina-1 e o BQ-3020 (Ihara *et al.*, 1992a,b; Nakamichi *et al.*, 1992; Aramori *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 1993; para revisão ver Huggins *et al.*, 1993). Infelizmente, não há ainda agonistas suficientemente seletivos para os receptores ET_A (Huggins *et al.*, 1993). Porém, já foram descritos diversos antagonistas seletivos do receptor ET_A, incluindo o FR 139317, o BQ-123, o BE-18257B e o CGS 26343A (Sogabe *et al.*, 1992; Nakamichi *et al.*, 1992; Ihara *et al.*, 1991; Bazil *et al.*, 1992), todos apresentando estrutura peptídica, e o composto não peptídico 50-235 (Fujimoto *et al.*, 1992). O único antagonista seletivo já descrito para receptores ET_B é o IRL 1038 (Karakci *et al.*, 1993). Há, ainda, alguns antagonistas não-seletivos peptídicos como o PD 142893 (Cody *et al.*, 1992), e pelo menos um não-peptídico, o composto Ro 46-2005 ou "bosentan" (Gray *et al.*, 1993), que é o único antagonista ativo por via oral (Clozel *et al.*, 1993).

Yanagisawa *et al.* (1988) postularam que a endotelina-1 induzia vasoconstrição por ativação direta dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo "L", pois o efeito contrátil era fortemente bloqueado pela nicardipina. Entretanto, vários estudos indicam

que a ativação desses canais nem sempre é necessária para a manifestação dos efeitos das endotelinas (Auguet *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; Guimarães *et al.*, 1992) e que, quando ela ocorre, decorre de ativação indireta (Goto *et al.*, 1989; Silberberg *et al.*, 1989; para revisão ver Simonson *et al.*, 1993). Assim, os mecanismos de ação das endotelinas são bastante complexos, podendo envolver a ativação de múltiplas enzimas e canais iônicos, bem como a liberação de várias substâncias.

A ativação de receptores para endotelinas na musculatura lisa vascular estimula a fosfolipase C a formar inositol trifosfato e diacilglicerol a partir do fosfatidilinositol bifosfato. A elevação dos níveis citosólicos de inositol trifosfato estimula a liberação de cálcio dos depósitos intracelulares sarcoplasmáticos (Resink *et al.*, 1988; Kasuya *et al.*, 1989; Rapoport *et al.*, 1990). Por outro lado, a elevação dos níveis de diacilglicerol ativa a proteína quinase C (Resink *et al.*, 1988; Muldoon *et al.*, 1989; Griendling *et al.*, 1989; Guimarães *et al.*, 1992). A contração resultante da formação desses dois segundos mensageiros pode depender da ativação subsequente de canais de cálcio voltagem dependentes do tipo "L" em alguns vasos (Yanagisawa *et al.*, 1988), mas não em outros (D'Orleans-Juste *et al.*, 1989). As endotelinas também estimulam a fosfolipase C em outros tipos de células, incluindo os neurônios (Reiser & Donié, 1990), células endoteliais (Vigne *et al.*, 1990), células mesangiais glomerulares (Simonson *et al.*, 1989), miocárdio (Vigne *et al.*, 1989) e músculos lisos não-vasculares (Garcia-Pascual *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1992). Estudos recentes demonstraram que a endotelina-1 também pode ativar a fosfolipase D, promovendo a formação de ácido fosfatídico, a partir da fosfatidilcolina, e sua posterior conversão em diacilglicerol (MacNulty *et al.*, 1991; Ambar & Sokolovsky, 1993).

Os íons sódio e potássio também têm sido demonstrados como participantes no

mecanismo de ação das endotelinas. O ativador de canais de potássio ATP-dependentes cromacalina e a valinomicina, um ionóforo de potássio, inibem de forma dose-dependente a atividade vasoconstritora da endotelina-1 (Kim *et al.*, 1989). A endotelina-1, em baixas doses (0.1 a 10 nM), potencializa a atividade de canais de potássio ativados por íons cálcio, mas em doses superiores a 10 nM inibe esses canais de forma irreversível (Hu *et al.*, 1991). A estimulação dos canais de potássio dependentes de ATP por cromacalina em anéis de veia porta isolada de rato atenua a atividade vasoconstritora da endotelina-1, sendo a inibição revertida por glibenclamida (Guimarães *et al.*, 1992). Battistini *et al.* (1991), utilizando os análogos da amilorida 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida e 5-(N,N-hexametileno) amilorida, demonstraram que a atividade constritora da endotelina-1 em anéis de traquéia e brônquio de suíno era reduzida por estes inibidores da bomba de Na^+/H^+ . Na artéria caudal isolada de rato a endotelina-1 diminui a concentração de AMPc (Yang *et al.*, 1991). Por outro lado, a endotelina-3, em baixas doses, eleva as concentrações citosólicas de GMPc em artéria mesentérica de rato pré-contráida com metoxamina (Fukuda *et al.*, 1991). Assim, as endotelinas podem causar seus efeitos através de múltiplos mecanismos, incluindo ativação de fosfolipases C e D, influxo de cálcio através de canais do tipo "L" e outros, estimulação da bomba Na^+/K^+ e/ou modulação da atividade da adenilato ciclase ou guanilato ciclase. Ainda, diversos efeitos das endotelinas são mediados pela liberação de outros mediadores, incluindo os eicosanóides e o óxido nítrico (para revisão ver Hyslop & De Nucci, 1992). Pulmões isolados de rato e/ou cobaia secretam prostaciclina e tromboxano A_2 quando perfundidos com endotelina-1 (De Nucci *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1992). O efeito broncoconstritor da endotelina-1, *in vivo*, em cobaias parece ser mediado inteiramente por tromboxano A_2 , pois é abolido por inibidores de cicloxigenase (Payne & Whittle, 1988;

Braquet *et al.*, 1989) e por antagonistas de receptores para tromboxano A₂ (Schumacher *et al.*, 1990; Lueddeckens *et al.*, 1993). Por outro lado, a inibição da síntese de eicosanóides pela via da cicloxigenase potencia os efeitos vasoconstritores da endotelina-1 no baço e rim de coelho, indicando que a produção dessas substâncias pode modular as ações do peptídeo de forma importante (Rae *et al.*, 1989). Resultados semelhantes foram obtidos em outros tecidos ou órgãos (De Nucci *et al.*, 1988; Miura *et al.*; 1989; Filep *et al.*; 1991; Suzuki *et al.*, 1992). A formação de eicosanóides em resposta às endotelinas pode ser mediada por ativação direta da fosfolipase A₂, ou como conseqüência do aumento de cálcio citosólico promovido pela estimulação da fosfolipase C (Reynolds *et al.*, 1989; Sokolovsky, 1992).

A endotelina-1 e a endotelina-3 também podem estimular a formação de óxido nítrico pelo endotélio vascular (De Nucci *et al.*, 1988). Nesse sentido, a remoção do endotélio ou o bloqueio das ações do óxido nítrico aumentam consideravelmente os efeitos vasoconstritores desses peptídeos no mesentério arterial perfundido de rato, além de bloquear os seus efeitos vasodilatadores iniciais (Warner *et al.*, 1989; Fukuda *et al.*, 1990). Inibidores da síntese de óxido nítrico também potencializam os efeitos hipertensivos da endotelina-1 *in vivo* (Gardiner *et al.*, 1990). Convém, ainda, mencionar que as endotelinas podem estimular a secreção de aldosterona por células adrenocorticais (Morishida *et al.*, 1989) e do peptídeo natriurético atrial (Hu *et al.*, 1988a; Schiebinger & Gomez-Sanchez, 1990), aumentam níveis plasmáticos de corticosterona (Hirai *et al.*, 1991), renina (Goetz *et al.*, 1988), mas inibem a liberação de prolactina (Samson *et al.*, 1990). A contribuição dessas ações na manifestação dos efeitos das endotelinas permanece a ser elucidada.

Entre os múltiplos efeitos das endotelinas, talvez o melhor caracterizado seja o

efeito vasoconstritor. A endotelina-1 é pelo menos 10 vezes mais potente que a angiotensina II, vasopressina ou o neuropeptídeo Y em contrair a artéria coronária de suíno (Yanagisawa *et al.*, 1988). As endotelinas causam ainda contrações pronunciadas da quase totalidade dos vasos sangüíneos testados (para revisão ver Masaki *et al.*, 1992), embora o efeito seja precedido, em certos casos, por um efeito vasodilatador (Warner *et al.*, 1989; Withrington *et al.*, 1989). Preparações vasculares venosas parecem ser até mais sensíveis à constrição por endotelinas do que as arteriais (De Nucci *et al.*, 1988, D'Orleans-Juste *et al.*, 1989). Confirmando seus efeitos em vasos isolados, as endotelinas induzem uma queda transiente da pressão arterial em ratos anestesiados, que é seguida por efeito hipertensor extremamente prolongado (Yanagisawa *et al.*, 1988; De Nucci *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989). Embora a hipertensão induzida pelas endotelinas decorra, principalmente, de um aumento pronunciado da resistência periférica, parte desse efeito pode ser conseqüência de ações inotrópicas e cronotrópicas cardíacas (Hu *et al.*, 1988b; Kitayoshi *et al.*, 1989). Os receptores responsáveis pelo efeito vasoconstritor das endotelinas parecem ser do tipo ET_A na maioria dos vasos, mas estudos recentes indicam que em alguns casos os receptores podem também ser do tipo ET_B (Davenport & Maguire, 1993). A infusão de endotelina-1 causa profunda diminuição do fluxo sangüíneo renal (Goetz *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Zimmerman *et al.*, 1990). Embora diversos estudos tenham evidenciado uma redução marcante da filtração glomerular pela endotelina-1, os efeitos do peptídeo sobre a excreção renal de sódio são pouco claros. Alguns autores observaram um nítido efeito natriurético em rim isolado (Ferrario *et al.*, 1989; Perico *et al.*, 1990), enquanto outros relataram um decréscimo da excreção renal de sódio pelo peptídeo *in vivo* (Goetz *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1989).

Os efeitos complexos das endotelinas nas diversas funções renais parecem decorrer da combinação de ações intra- e extra-renais (para revisão ver Simonson, 1993).

As endotelinas também atuam sobre a musculatura lisa não vascular em diversos órgãos dos tratos respiratório, geniturinário e gastrointestinal. Assim, as endotelinas causam contração pronunciada do brônquio e traquéia isolados de cobaia, mediada em parte por ativação de canais de cálcio voltagem dependentes do tipo "L" (Maggi *et al.*, 1988b). O efeito broncoconstritor da endotelina-1 nessa espécie parece depender de modo importante na liberação de tromboxano A₂ (Payne & Whittle, 1988), mas em outras espécies, incluindo a humana, essa participação não é tão importante (para revisão ver Hay *et al.*, 1993). Os receptores responsáveis por esse efeito parecem ser principalmente do tipo ET_B na cobaia (Hay *et al.*, 1993), mas no rato ambos os receptores ET_A e ET_B estão implicados (Henry, 1993).

A endotelina-1, endotelina-3 e sarafotoxina S6c contraem tiras de bexiga e anéis de pelve renal humanas (Maggi *et al.*, 1989c; Maggi *et al.*, 1990). As ordens de potências relativas dos agonistas sugerem que esses efeitos sejam mediados por receptores ET_A e ET_B, respectivamente, mas outros estudos são necessários para reforçar essa hipótese. Ainda, a endotelina-1 também causa contração pronunciada da bexiga e uretra isolada de coelho, por um mecanismo fortemente dependente de cálcio extracelular (Garcia-Pascual *et al.*, 1990). A exemplo do que foi observado em outros tratos, as endotelinas exercem diversos efeitos nos órgãos genitais. Sakaguchi *et al.* (1992) identificaram sítios ligantes para as endotelinas, em ordem de afinidade endotelina-1 = endotelina-2 >> endotelina-3 >> big-endotelina-1, nas células intersticiais e peritubulares mióides do testículo de rato. A exposição de células mióides à endotelina-1 determina contração mediada por ativação

de fosfolipase C (Filipini *et al.*, 1993). Também no canal deferente, as endotelinas causam discreta contração direta e potenciação marcante das respostas neurogênicas simpáticas (Télémaque & D'Orleans-Juste, 1991; Rae & Calixto, 1990), sendo esses efeitos mediados possivelmente por receptores atípicos (Eglezos *et al.*, 1993; Warner *et al.*, 1993a). No corpo cavernoso isolado de coelho e humano, a endotelina-1 induz potente contração, susceptível à inibição pelo carbacol e peptídeo intestinal vasoativo, VIP, (Holmquist *et al.*, 1990). No trato genital feminino, a endotelina-1 e demais peptídeos da família aumentam o tônus e a frequência das contrações espontâneas do útero de rata (Bouso-Mittler *et al.*, 1989; Calixto & Rae, 1991), possivelmente por ativação de receptores ET_A (Rae *et al.*, 1993). Resultados semelhantes foram obtidos no útero humano não-grávido (Word *et al.*, 1990).

Grandes quantidades de endotelina-1 são encontradas ao longo do trato gastrointestinal de rato, incluindo o estômago, intestino delgado, cólon e, em menor grau, no fígado (Matsumoto *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990). O intestino delgado também contém quantidades abundantes de endotelina-3, mas em outros órgãos do trato os teores do peptídeo são menores (Matsumoto *et al.*, 1989). O ileo de camundongo sintetiza tanto VIC (peptídeo contracturante intestinal vasoativo) quanto endotelina-1 (Saida *et al.*, 1989), enquanto o de cobaia sintetiza pelo menos endotelina-1 (MacCumber *et al.*, 1989). A endotelina-1 e a endotelina-3 também ocorrem no baço e no pâncreas (Bloch *et al.*, 1989). Por outro lado, tanto o estômago quanto o cólon humano contêm endotelina-3 e/ou endotelina-1 (Inagaki *et al.*, 1991a,b; Saeki *et al.*, 1993), mas a presença de endotelinas em outros órgãos do trato gastrointestinal humano não foi esclarecida. As endotelinas estão presentes nas células principais, parietais e neuroendócrinas do epitélio gástrico de rato e humano (Saeki *et al.*, 1993). No intestino delgado e cólon de rato a maior parte da

endotelina-1 é encontrada na camada mucosa (Takahashi *et al.*, 1990), mas no cólon humano, a exemplo do que se observa no estômago (Saeki *et al.*, 1993), o peptídeo ocorre tanto na mucosa quanto em plexos neuronais (Inagaki *et al.*, 1991a,b).

As endotelinas causam contração pronunciada em preparações de estômago de rato (De Nucci *et al.*, 1988; Eglen *et al.*, 1989, Spokes *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990; Fulginiti *et al.*, 1993; Warner *et al.*, 1993a). Esse efeito parece decorrer da ativação de um subtipo de receptor ET_B , dada a equipotência entre a endotelina-1 e a sarafotoxina S6c e a resistência das contrações ao bloqueio por BQ-123 ou PD 142893 (Warner *et al.*, 1993a), e depende fortemente do influxo de íons cálcio através dos canais do tipo "L", mas não da síntese de eicosanóides (Fulginiti *et al.*, 1993). Por outro lado, a endotelina-1, mas não a endotelina-3, relaxa tiras de musculatura longitudinal ou circular de estômago de rato pré-contraídas com prostaglandina E_2 , possivelmente por interação com receptores ET_A e estimulação de canais de potássio ativados por cálcio (Fulginiti *et al.*, 1993). Tais achados estão de acordo com a demonstração de sítios de ligação característicos de receptores ET_A e ET_B no tecido (Takayanagi *et al.*, 1991).

As endotelinas também são potentes agentes ulcerogênicos em ratos (Whittle & Espluges, 1988; MacNaughton *et al.*, 1989; Wallace *et al.*, 1989a,b). Entretanto, esse efeito parece ser mais uma consequência do efeito vasoconstritor dessas substâncias, levando a uma menor oxigenação e remoção de ácido da mucosa, do que pela contração da musculatura lisa não-vascular (Wallace *et al.*, 1989a,b; Lazaratos *et al.*, 1993a). Há, ainda, sinergismo entre os efeitos ulcerogênicos da endotelina-1, do etanol e da indometacina (MacNaughton *et al.*, 1989; Wallace *et al.*, 1989a,b; Peskar *et al.*, 1992; Masuda *et al.*, 1993), possivelmente porque esses agentes aumentam a produção de

endotelina-1 pela mucosa gástrica (Kitajima *et al.*, 1993; Masuda *et al.*, 1992, 1993).

Os efeitos da endotelina-1 no jejuno de coelho são semelhantes ao que se verifica em alguns vasos isolados, compreendendo um relaxamento transiente seguido de contração pronunciada (Lembeck *et al.*, 1989). Algumas preparações exibem, ainda, uma supressão da atividade espontânea que coincide com o relaxamento. Não se sabe qual o tipo de receptor envolvido nesses efeitos no coelho, mas o jejuno humano expressa receptores ET_B (Sakamoto *et al.*, 1991). A endotelina-1 também induz contração tônica do cólon de rato, possivelmente por estimular a produção de eicosanóides da via da cicloxigenase e por mobilização de estoques intracelulares de cálcio (Moumami *et al.*, 1992a). Diferentemente, a contração induzida pelo peptídeo na musculatura reto-sigmoídea de coelho depende também do influxo de cálcio (Bitar *et al.*, 1992). Em gatos, a endotelina-1 e o VIC aumentam a liberação de VIP pelo cólon (Blank *et al.*, 1991). É interessante ressaltar que, pelo menos no cólon humano, a endotelina-1 é encontrada principalmente em neurônios entéricos que também contêm VIP (Inagaki *et al.*, 1991a). Por outro lado, a *taenia coli* de cobaia é pouco susceptível aos efeitos contráteis da endotelina-1 (Sakata *et al.*, 1989), mas, quando pré-contráida com carbacol, responde com um relaxamento que parece envolver canais de potássio sensíveis à apamina (Usune *et al.*, 1991). Na *taenia coli* de coelho, a endotelina-1 causa contração e inibe as respostas à estimulação elétrica transmural (Wiklund *et al.*, 1991).

A possibilidade das endotelinas afetarem a motilidade colônica por ações em neurônios mioentéricos e na musculatura lisa é reforçada pela presença de receptores para esses peptídeos nessas células, no cólon de rato (Koseki *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990) e humano (Inagaki *et al.*, 1991a,b). Entretanto, convém mencionar que a endotelina-1 também estimula a secreção colônica de ânion cloreto no rato (Moumami *et*

al., 1992a; Kiyohara *et al.*, 1993) e no coelho (Brown & Smith, 1989; Roden *et al.*, 1992). No coelho esse efeito está associado à secreção de potássio (Roden *et al.*, 1992), mas no rato se verifica uma inibição concomitante da reabsorção de sódio e cloreto (Kiyohara *et al.*, 1993). Em ambas as espécies, essas ações da endotelina-1 são bloqueadas por diuréticos de alça ou indometacina. Pelo menos no rato, as alterações secretórias produzidas pela endotelina-1 envolvem a ativação de receptores ET_A (Kiyohara *et al.*, 1993).

A exemplo da colecistocinina, a endotelina-1 também é um potente agonista contrátil na vesícula biliar de cobaia (Moumami *et al.*, 1992b), e aumenta a frequência das contrações de canais biliares hepáticos de rato (Kamimura *et al.*, 1993). Nessas últimas estruturas, a endotelina-1 parece associar-se a três macromoléculas (talvez receptores) distintas (Gandhi *et al.*, 1992). A endotelina-1 também causa contração da musculatura capsular de baço de coelho (Rae *et al.*, 1989) e cão (Withrington *et al.*, 1992). Na última espécie, a endotelina-1 é mais potente que a endotelina-3, sugerindo que os receptores presentes sejam do tipo ET_A . Por outro lado, há relatos da presença de sítios de ligação para endotelina-1 no baço de cão (Loffler & Lohrer, 1991), porco (Hemsén, 1991) e rato (Jeng *et al.*, 1990).

Hiley *et al.* (1989) evidenciaram um efeito bifásico da endotelina-1 no fêto isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo. O primeiro componente de ação é caracterizado por uma redução transitória das respostas neurogênicas, que é substituído prontamente pelo segundo componente, qual seja, uma contração sustentada. Como a nifedipina bloqueou apenas o segundo componente de ação da endotelina-1, foi sugerido que os dois efeitos envolviam mecanismos celulares distintos.

A possibilidade de que a inibição das contrações neurogênicas do íleo reflète uma atuação neuronal da endotelina-1 é reforçada por achados em outros tecidos. Na artéria femoral de cobaia, a endotelina-1 induz vasoconstrição direta e potencializa o efeito vasoconstritor da noradrenalina, mas inibe a liberação de [³H]noradrenalina induzida por estimulação elétrica (Wiklund *et al.*, 1988). Tabuchi *et al.* (1989) demonstraram que o peptídeo, em baixas concentrações, também inibe a vasoconstrição por estimulação elétrica do mesentério arterial perfundido de rato. Ao contrário, a endotelina-1 potencializa as respostas neurogênicas do mesentério venoso perfundido de rato, mas não está claro se esse efeito envolve aumento da liberação de neurotransmissores simpáticos (Warner *et al.*, 1990). No átrio de rato, a endotelina-1 reduz os efeitos inotrópicos e cronotrópicos da estimulação de fibras simpáticas, sem, contudo, modificar a liberação de noradrenalina (Reid *et al.*, 1989). Ao contrário, células cromafins da glândula adrenal de bovino secretam noradrenalina e adrenalina quando estimuladas por endotelina-1 ou sarafotoxina S6b (Boarder & Marriott, 1991). Na artéria caudal de rato a endotelina-1 aumenta a liberação de noradrenalina triciada e potencializa a vasoconstrição induzida por estimulação elétrica (Bucher *et al.*, 1991). No canal deferente de rato, cobaia e camundongo, as endotelinas causam marcada e sustentada potencialização das contrações neurogênicas acompanhada de aumento modesto do tônus basal, mediado pelo menos em parte por ações pós-juncionais (Rae & Calixto, 1990; Wiklund *et al.*, 1990; Shoji & Goto, 1990).

2 - OBJETIVOS

Em vista do exposto na Introdução, o presente estudo foi realizado com o propósito de:

- 1. Comparar os efeitos da endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3 e da sarafotoxina S6c no fêlo isolado de cobaia submetido a estimulação elétrica de campo.**
- 2. Caracterizar os receptores envolvidos na produção dos efeitos das endotelinas nessa preparação.**
- 3. Procurar identificar alguns dos mecanismos celulares subjacentes às ações das endotelinas no fêlo de cobaia.**

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Os experimentos foram conduzidos com cobaias de ambos os sexos, pesando entre 350 a 450 g, criadas no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (6 a 10 por gaiola) em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (luz ligada das 6 às 18 h). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Ainda, a cada 3 dias, os animais receberam vegetais frescos como dieta complementar.

3.2 - Montagem das preparações

Após o sacrifício do animal, por forte pancada na nuca e deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta para retirada de um segmento de íleo situado entre 10 e 30 cm da junção ileocecal. Com auxílio de uma pipeta de 10 ml, lavou-se a luz do segmento com 10 a 20 ml de solução fisiológica de Krebs-Henseleit aquecida e oxigenada, e retirou-se os excessos de tecido adiposo e mesentérico. O segmento de íleo foi então dividido em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento, que foram mantidos em um copo de "Becker" contendo 50 a 100 ml da mesma solução aquecida e oxigenada até 4 horas após o sacrifício do animal.

Paulatinamente, os fragmentos foram transferidos para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,8; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 0,9; NaHCO₃ 25; glicose 11 - pH 7.4) à 37 °C, borbulhada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Cada preparação foi posicionada entre dois eletrodos de platina (consistindo de um gancho situado 3 cm abaixo de um anel de 3 mm de diâmetro; fio de 0,6 mm de diâmetro), conectada com linha de sutura a um transdutor

diâmetro; fio de 0,6 mm de diâmetro), conectada com linha de sutura a um transdutor isométrico e distendida a uma tensão basal 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). O tempo de equilíbrio de cada preparação foi de no mínimo 30 min, durante o qual a solução fisiológica foi renovada a intervalos de 10 min.

3.3 - Estimulação elétrica de campo

Após os 30 min de equilíbrio, a maioria das preparações foi submetida à estimulação elétrica de campo com pulsos retangulares de 1 ms de duração e voltagem supramáxima (60 a 70 V), aplicados a uma frequência de 0,1 Hz. Os pulsos elétricos foram gerados por um estimulador elétrico confeccionado pela UFSC.

3.4 - Curvas concentração-efeito às endotelinas e ao Bay K 8644

Experimentos preliminares evidenciaram dessensibilização marcante aos efeitos da administração de concentrações cumulativas de endotelina-1 (1 a 30 nM) no íleo submetido à estimulação elétrica (N = 4; resultados não apresentados). Para minimizar a ocorrência de dessensibilização, todas as curvas concentração-efeito para os diferentes efeitos das endotelinas e do Bay K 8644 foram obtidos por exposição de cada um dos diversos fragmentos, retirados de um mesmo animal, a uma única concentração de agonista. As adições foram efetuadas apenas após a estabilização das contrações eficientes por estimulação elétrica. Foram obtidas curvas concentração-efeito para endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3 (1 a 30 nM), sarafotoxina S6c (0,1 a 30 nM) e Bay K 8644 (3

a 1000 nM).

3.5 - Caracterização dos receptores envolvidos nos efeitos das endotelinas

Para identificar os tipos de receptores ativados pela endotelina-1 para indução dos seus efeitos, foram realizados dois tipos de experimentos. Na primeira série, foram construídas curvas dose-resposta não-cumulativas à endotelina-1 (1 a 30 nM) ou à sarafotoxina S6c (0.1 a 30 nM) na ausência ou na presença do antagonista seletivo de receptores ET_A, BQ-123 (30 ou 100 nM). O antagonista foi adicionado à cuba 10 min antes do agonista. Na segunda série de experimentos, fragmentos de fleo foram expostos à endotelina-1 (3 nM) ou sarafotoxina S6c (10 nM) por 5 min. Trinta minutos após a remoção do agonista, as preparações foram expostas a um dos dois agonistas, para evidenciar a ocorrência de dessensibilização.

3.6. Mecanismos de ação da endotelina-1 no fleo

Na tentativa de elucidar alguns dos mecanismos celulares subjacentes aos efeitos das endotelinas no fleo de cobaia, foram realizados diversos experimentos para analisar a influência de várias drogas sobre as respostas induzidas pela endotelina-1 (3 nM), entre as quais: a tetrodotoxina (300 nM), um bloqueador de canais de sódio voltagem dependentes; a atropina (300 nM), um antagonista muscarínico não-seletivo; a indometacina (5,6 μ M), um bloqueador da cicloxigenase; a nicardipina (100 nM), um bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, cromacalina (10 μ M) e glibenclamida (3 μ M), um agonista e antagonista dos canais de potássio ATP-dependentes, respectivamente. Na maioria desses experimentos, a endotelina-1 foi

adicionada à cuba 5 a 10 min após a incubação com a droga teste e a estabilização das respostas à estimulação elétrica na sua presença. A indometacina, no entanto, foi adicionada à solução pelo menos 30 min antes da exposição à endotelina-1. As concentrações das diversas drogas utilizadas foram escolhidas tomando por base estudos anteriores (Yanagisawa *et al.*, 1988; De Nucci *et al.*, 1988; Rae *et al.*, 1989; Schworer & Kilbinger, 1989). Em alguns experimentos a endotelina-3 (3 nM) foi empregada ao invés da endotelina-1, enquanto que, em outros, a nicardipina, a cromacalina e a glibenclamida foram adicionados após a endotelina-1. As respostas obtidas à endotelina-1 (ou endotelina-3) na presença de uma droga teste foram sempre comparadas com aquelas evocadas pelo peptídeo em preparações controle, retiradas do mesmo animal.

Para detectar o possível envolvimento de proteínas G_i ou G_o nos mecanismos de transdução das respostas à endotelina-1, um grupo de animais foi pré-tratado com toxina de *Bordetella pertussis* (50 μ g/kg, i.p.) 6 dias antes do sacrifício. A reatividade das preparações obtidas desses animais à endotelina-1 (1 a 30 nM) foi comparada com a de fragmentos de íleo de cobaias pré-tratadas com salina (1 ml/kg, i.p.). A eficácia do pré-tratamento com a toxina de *Bordetella pertussis*, em inativar proteínas G_i e/ou G_o , no íleo, foi avaliada através da comparação dos efeitos da morfina (10 nM a 3 μ M) sobre as respostas de preparações à estimulação elétrica (Luján *et al.*, 1984). Nesses experimentos, concentrações crescentes do opióide foram adicionadas isoladamente à cuba por 2-3 min, a intervalos de 20 min.

Outra série de experimentos foi realizada para investigar a influência da endotelina-1 sobre a reatividade do íleo de cobaia à acetilcolina (30 nM), histamina (100 nM), bradicinina (10 nM) ou substância P (1 nM). Nesses experimentos, as preparações

não submetidas à estimulação elétrica foram expostas duas vezes a um dos agonistas por 1 a 3 min, com intervalo de repouso de 20 min entre cada dose. A endotelina-1 (0,3 a 30 nM) foi adicionada à cuba 5 min antes da indução da segunda resposta ao agonista, que foi obtida na presença do peptídeo. Algumas preparações foram pré-contraídas, na ausência de estimulação elétrica, com acetilcolina (0,3 μ M) ou histamina (1 μ M) e, 10 min após a adição do agonista e na presença desse, expostas à endotelina-3 (3 ou 30 nM).

3.7 - Drogas, sais e soluções

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

As seguintes drogas foram utilizadas: endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3 (todas humanas, Peptide Institute Inc., Osaka - Japão ou Louisville - EUA ou Sigma Chemical Co., Saint Louis - EUA), Bay K 8644 (doada pela Bayer A.G., Wuppertal - Alemanha), cloridrato de morfina e sulfato de atropina (Merck A.G., Darmstadt - Alemanha), L,D-cromacalina (Beecham Pharmaceuticals, Betchworth - Inglaterra), BQ-123 (Bachem California, Torrance - EUA), iodeto de acetilcolina, bradicinina, cloridrato de carbacol, glibenclamida, difosfato de histamina, indometacina, nicardipina, sarafotoxina S6c, substância P, tetrodotoxina e toxina de *Bordetella pertussis* (todas da Sigma Chemical Co., Saint Louis - EUA).

Todos os peptídeos foram dissolvidos em solução tamponada com fosfato. A indometacina, nicardipina e o Bay K 8644 foram dissolvidos em etanol P.A. absoluto, e a cromacalina em etanol a 70%. A glibenclamida foi dissolvida em solução de hidróxido de sódio a 0,07 N, contendo 1,7% de glicose. As demais drogas foram dissolvidas em solução de NaCl 0,9%. A maior parte das drogas foi armazenada em soluções estoque (10

μM a 1 mM), mantidas em tubos siliconizados a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, que foram diluídas até a concentração desejada imediatamente antes de serem utilizadas. Com exceção das drogas peptídicas, o tempo máximo de uso das soluções estoques foi de 15 dias. Para minimizar a fotodegradação das diidropiridinas, nicardipina e Bay K 8644, as soluções estoque dessas drogas foram mantidas em frascos embrulhados em folha de alumínio. Ainda, nos experimentos em que se fez uso dessas drogas, as cubas de vidro foram protegidas da luz com folhas de alumínio e a iluminação do laboratório foi mantida em níveis mínimos.

3.8 - Apresentação dos resultados e análise estatística

As inibições das respostas neurogênicas, bem como as contrações induzidas pelas endotelinas e outras drogas foram calculadas como porcentagens das respostas basais de cada preparação à estimulação elétrica. Estes parâmetros são apresentados como média \pm erro padrão da média. As concentrações efetivas 50% (CE_{50} ; i.e. as concentrações necessárias para causar a metade da contração máxima) e as concentrações inibitórias 50% (CI_{50} ; i.e. as concentrações necessárias para inibir em 50% as respostas neurogênicas) foram calculadas através da interpolação gráfica dos efeitos causados pelas diversas concentrações do agonista em diferentes preparações de um mesmo animal. Esses valores são apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança para 95% (Fleming *et al.*, 1972).

A análise estatística dos resultados foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste "t" bicaudal de Student para amostras pareadas ou não-pareadas, quando mais apropriado (Snedecor & Cochran, 1967). Diferenças entre grupos com níveis de probabilidade menores do que 5% ($P < 0.05$) foram consideradas estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 - Efeitos da estimulação elétrica

A estimulação elétrica de campo determinou o surgimento de contrações rápidas e voltagem-dependentes do íleo de cobaia, bem como queda progressiva do tônus da preparação durante os primeiros 5 a 10 min. Quando estimulada com pulsos de voltagem supramáxima (70 V) a 0,1 Hz, as contrações da preparação estabilizaram em $1,97 \pm 0,06$ g (N = 150), enquanto o tônus basal foi reduzido em $0,18 \pm 0,02$ g (N = 150). A exposição das preparações à tetrodotoxina ($1 \mu\text{M}$) ou à atropina ($0,3 \mu\text{M}$) resultou em inibição quase que completa ($97 \pm 3\%$ e $94 \pm 1,5\%$, respectivamente, N = 6) das respostas à estimulação elétrica, indicando que as mesmas foram eliciadas por ativação de motoneurônios colinérgicos.

4.2 - Efeitos da endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3 e sarafotoxina S6c

A endotelina-1 induziu resposta bifásica e concentração-dependente do íleo de cobaia, caracterizada por uma inibição transiente das respostas neurogênicas, seguida por aumento sustentado do tônus da preparação. A manifestação do efeito inibitório geralmente tinha início 5 a 10 s após a adição do peptídeo, atingia um pico aos 60 s e diminuía progressivamente nos min subseqüentes. O efeito contrátil normalmente começava 20 a 60 s depois da administração da endotelina-1, atingia um pico dentro de 3 min, após o qual a resposta recidia lentamente. Um registro experimental típico do efeito bifásico da endotelina-1 é ilustrado na figura 1A.

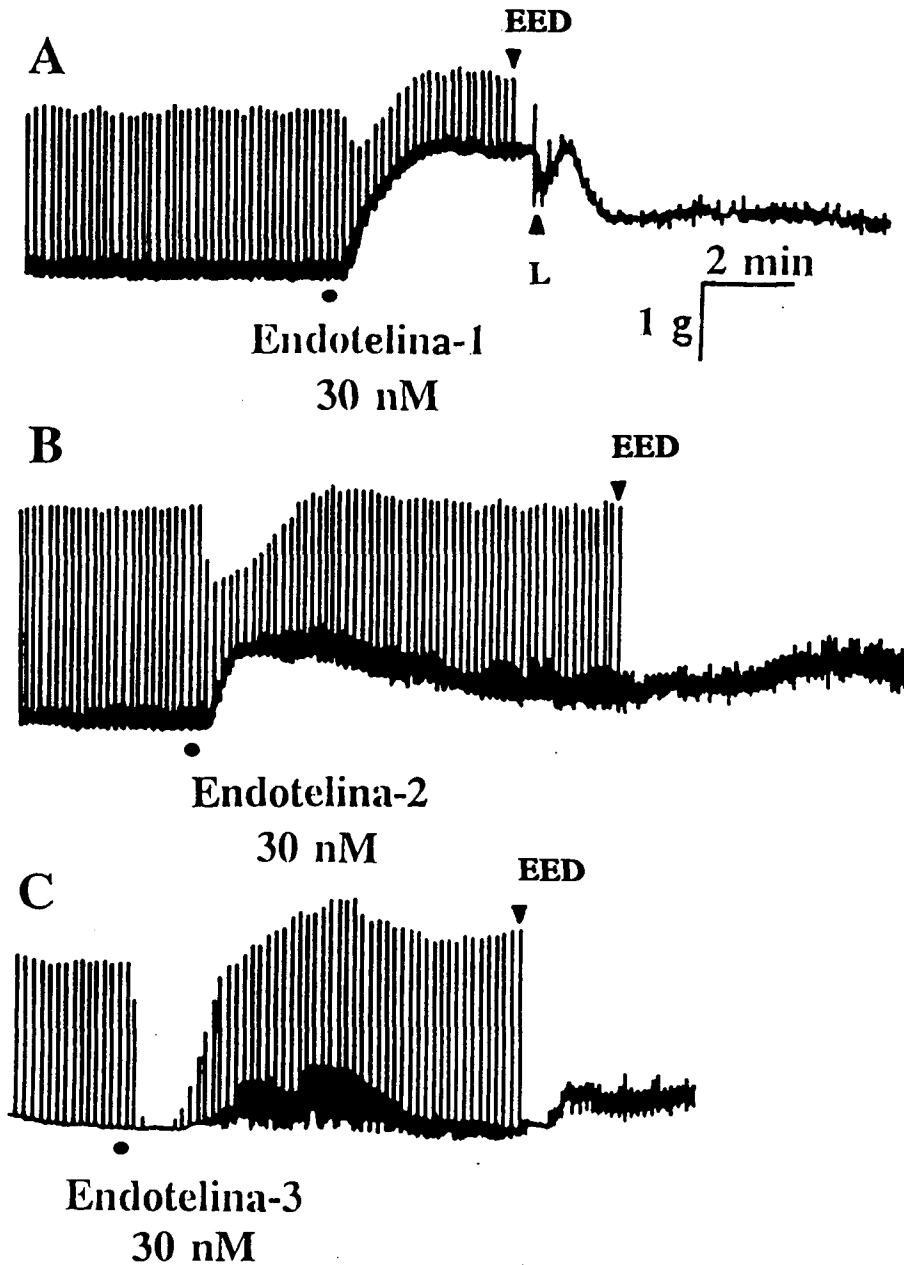


FIGURA 1 - Registros isométricos típicos dos efeitos bifásicos da endotelina-1 (A), endotelina-2 (B) e endotelina-3 (C) no fleo isolado de cobraia submetido à estimulação elétrica de campo a 0,1 Hz. "L" e "EED" indicam lavagem da preparação e interrupção da estimulação elétrica, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos em pelo menos 4 outros experimentos.

Embora os efeitos da endotelina-2 e da endotelina-3 tenham sido qualitativamente semelhantes ao da endotelina-1 (figura 1B e 1C), houve diferenças quantitativas quanto à habilidade das endotelinas em induzir cada componente do efeito bifásico. A endotelina-1 e a endotelina-3 foram mais potentes que a endotelina-2 ($P < 0.05$) em inibir as respostas neurogênicas. As CI_{50} s os intervalos de confiança da endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3 para a indução do componente inibitório foram, respectivamente: 1,5 nM (0,6 - 3,7; $N = 5$), 10,5 nM (3,3 - 33,5; $N = 6$) e 1,2 nM (0,5 - 2,5; $N = 6$). Além disso, a inibição máxima causada pela endotelina-3 ($95,4 \pm 1,3$) foi significativamente maior ($P < 0.05$) que pela endotelina-1 ($70,5 \pm 6,8$) ou endotelina-2 ($57,9 \pm 4,8$). Esses resultados são resumidos na tabela 1 e ilustrados na figura 2.

Em contraste, a endotelina-1 e a endotelina-2 foram mais potentes que a endotelina-3 ($P < 0.05$) na produção do componente contrátil, fornecendo CE_{50} s de 2,3 nM (1,2 - 4,2; $N = 5$), 2,5 nM (1,4 - 4,4; $N = 6$) e 8,2 nM (4,5 - 14,8; $N = 6$), respectivamente. Ainda, foi observado que a endotelina-1 induziu contração máxima maior ($70,3 \pm 15,6$) que a endotelina-2 ($41,6 \pm 3,5$) ou a endotelina-3 ($19,9 \pm 11,2$). Esses resultados são resumidos na tabela 1 e ilustrados na figura 3.

A figura 4 (A e B) apresenta os resultados médios de experimentos comparando os efeitos da endotelina-1 e do agonista seletivo de receptores ET_B , sarafotoxina S6c, no íleo de cobra. Não foram detectadas diferenças entre as potências ou as eficácias de ambos os agonistas em inibir as respostas neurogênicas ($P > 0.05$; figura 4A). Por outro

lado, a endotelina-1 mostrou-se muito mais potente que a sarafotoxina S6c em induzir contração no íleo, sendo que mesmo na maior concentração testada (30 nM), a sarafotoxina S6c causou um efeito menor que o determinado por 1 nM de endotelina-1 ($P < 0.05$; figura 4B).

Tabela 1 - Efeitos da endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2), endotelina-3 (ET-3), sarafotoxina S6c (S6c) e Bay K 8644 no íleo de cobaia submetido a estimulação elétrica de campo. Cada valor representa a média de 5 a 8 experimentos.

AGONISTA	INIBIÇÃO DAS RESPOSTAS NEUROGÊNICAS		CONTRAÇÃO	
	CI ₅₀ (nM) ^a	I _{max} ^b	CE ₅₀ (nM) ^c	E _{max} ^d
ET-1	1,5 (0,6-3,7)	70,5 ± 6,8	2,3 (1,2-4,2)	70,3 ± 15,6
ET-2	10,5 (3,3-33,5)*	57,9 ± 4,8*	2,5 (1,4-4,4)	41,6 ± 3,5*
ET-3	1,2 (0,5-2,5)	95,4 ± 1,3*	8,2 (4,5-14,8)*	19,9 ± 11,2*
S6c	0,6 (0,3-1,3)	85,1 ± 4,4	> 10*	29,2 ± 3,7*
BAY K 8644	62,1 (40,8-94,6)*	29,2 ± 7,8* ^e	199 (122-324)*	14,7 ± 3,4*

^a Média geométrica da concentração que inibe as respostas neurogênicas em 50%, acompanhada dos limites de confiança para 95%.

^b Média ± E.P.M. da inibição porcentual máxima das contrações neurogênicas.

^c Média geométrica da concentração que induz 50 % da resposta contrátil, acompanhada dos limites de confiança para 95 %.

^d Média ± E.P.M. da resposta contrátil máxima, expressa como porcentagem da resposta neurogênica basal.

^e Média ± E.P.M. do aumento máximo das respostas neurogênicas induzidas pelo Bay K 8644.

* P < 0.05 em relação à endotelina-1 (teste "t" de Student para amostras não pareadas).

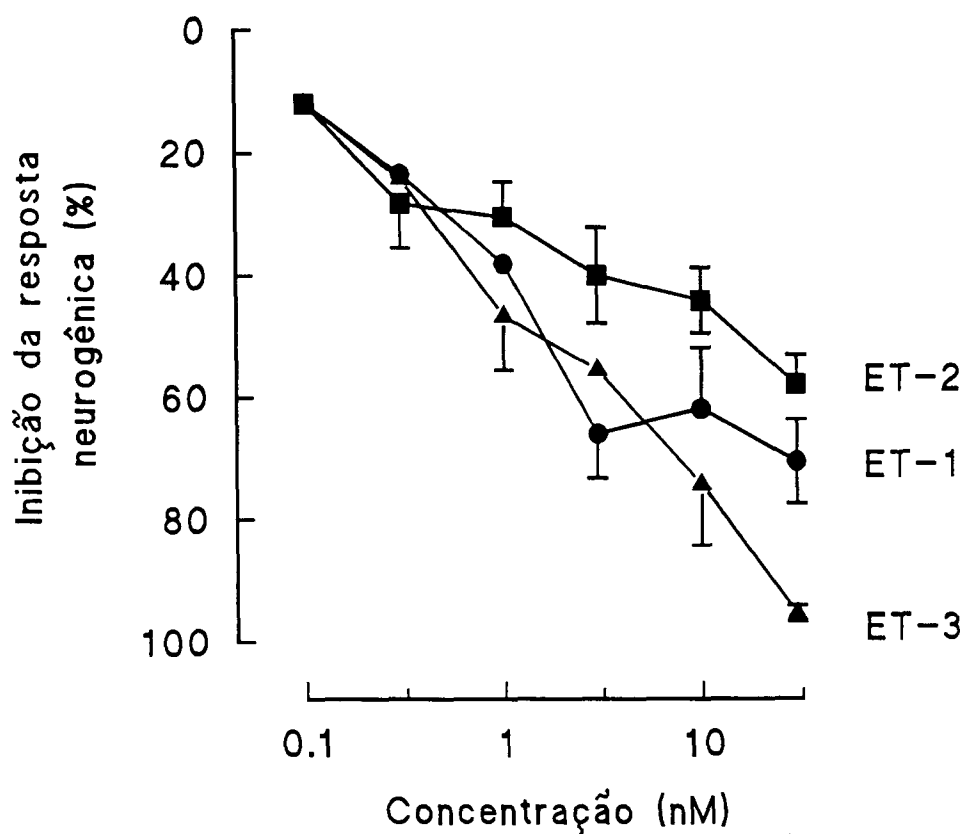


FIGURA 2 - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos depressores da endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) nas respostas neurogênicas do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica a 0,1 Hz. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 a 6 observações.

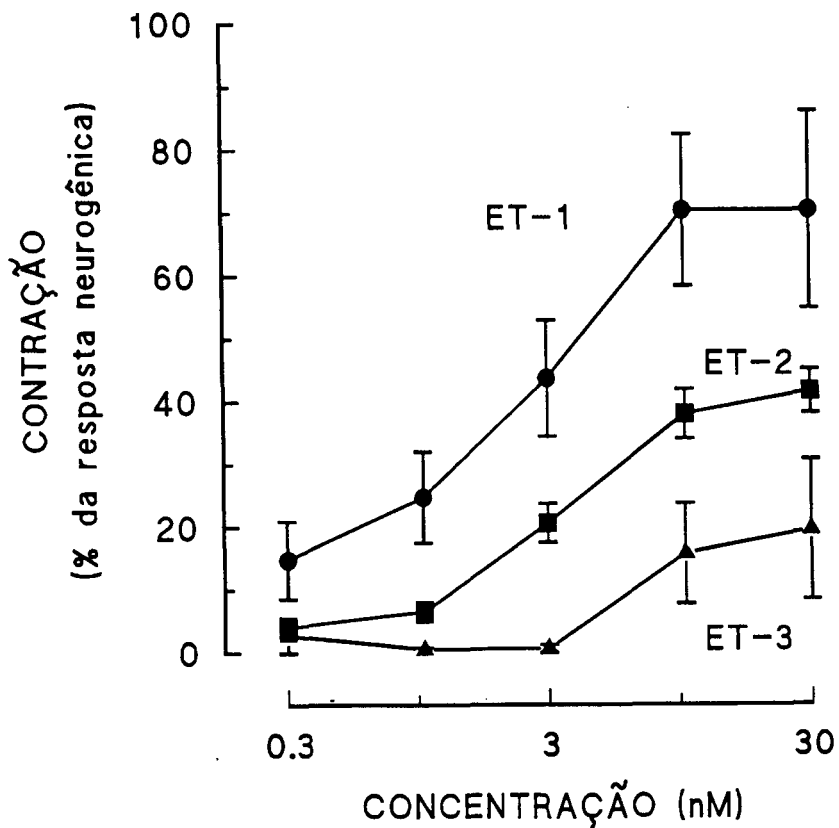


FIGURA 3 - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos contráteis da endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica a 0,1 Hz. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 a 6 observações.

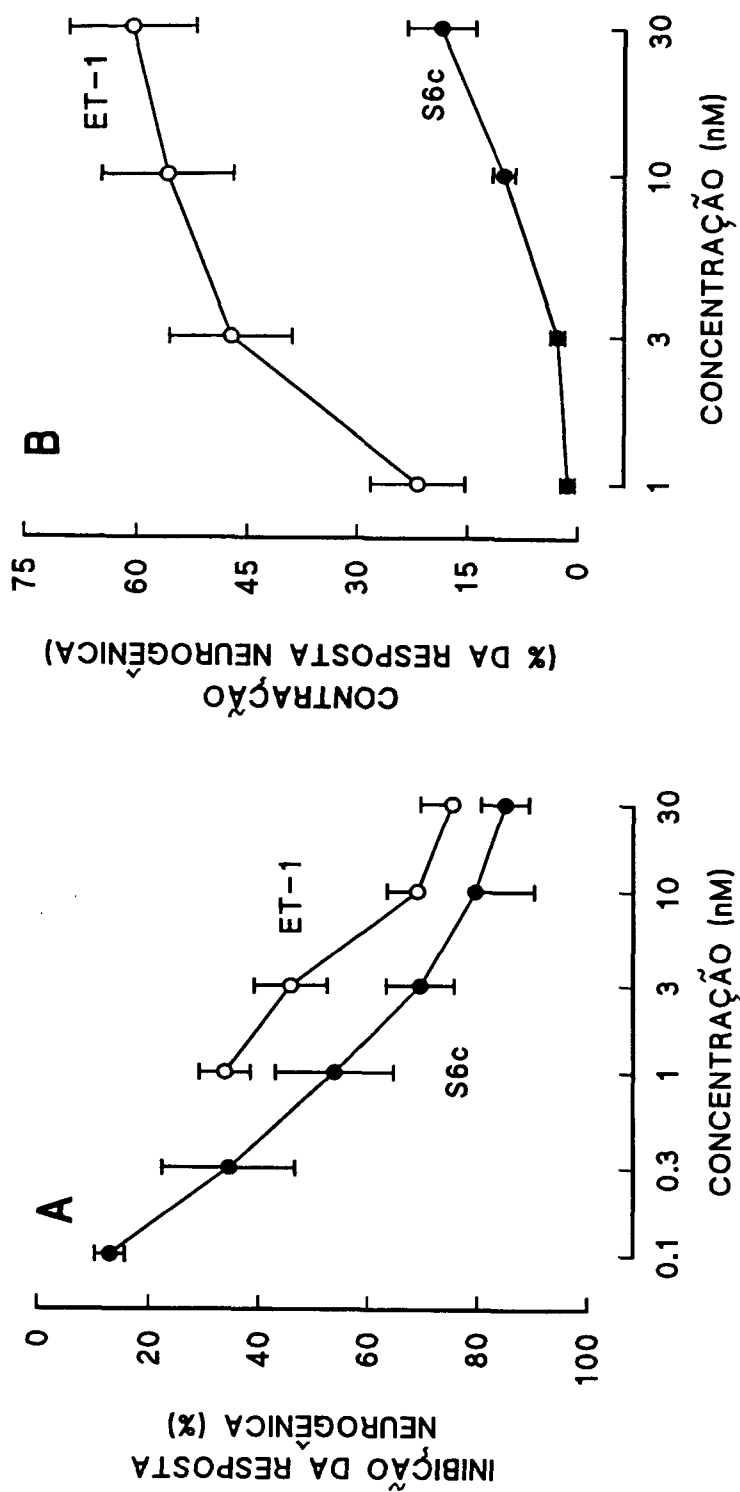


FIGURA 4 - Comparação dos efeitos da endotelina-1 (ET-1) e da sarafotoxina S6c (S6c) no fêo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo a 0,1 Hz. O painel "A" ilustra os resultados relativos à inibição das contrações neurogênicas, enquanto o painel "B" apresenta os efeitos contráteis de ambos os agonistas. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 observações.

4.3 - Influência do BQ-123 nos efeitos da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c

O antagonista seletivo de receptores ET_A , BQ-123 (30 e 100 nM), não modificou os efeitos inibitórios da endotelina-1 (1, 3 e 10 nM) ou da sarafotoxina S6c (1, 3 e 10 nM), como ilustra a figura 5. Embora as inibições das respostas neurogênicas causadas pelos agonistas na presença do BQ-123 tendessem a ser maiores do que as evidenciadas na ausência do antagonista, as diferenças não atingiram o limite de significância ($P > 0.05$). No entanto, o BQ-123 inibiu de forma pronunciada as contrações induzidas pela endotelina-1 e, em menor grau, pela sarafotoxina S6c. Conforme mostram os resultados da figura 6A, as contrações causadas pelas 3 concentrações de endotelina-1 foram igualmente reduzidas pelas duas concentrações de BQ-123 ($P < 0.05$). Ao contrário, apenas a contração causada pela maior concentração de sarafotoxina S6c (30 nM) foi inibida pelo BQ-123 ($P < 0.05$; figura 6B).

4.4 - Dessensibilização à endotelina-1 e à sarafotoxina S6c

Os resultados dos experimentos realizados para avaliar a ocorrência de dessensibilização homóloga aos efeitos da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c, bem como a possível existência de dessensibilização cruzada entre ambos os agonistas, são ilustrados nas figuras 7 e 8. Evidenciou-se dessensibilização marcante aos efeitos inibitórios da endotelina-1 (3 nM) ou da sarafotoxina S6c (10 nM) sobre as contrações neurogênicas em preparações pré-incubadas com endotelina-1 (3 nM) por 10 min, 30 min antes ($P < 0.05$; fig. 7). De modo semelhante, em experimentos análogos, a exposição prévia da preparação à sarafotoxina S6c também induziu o desenvolvimento de dessensibilização a este peptídeo e à endotelina-1 ($P < 0.05$). Diferentemente, a exposição prévia à endotelina-1 reduziu seletivamente a contração induzida por uma segunda exposição ao agonista ($P < 0.05$), sem alterar a resposta à sarafotoxina S6c ($P > 0.05$; figura 8). Por outro lado, quando a preparação foi exposta inicialmente à sarafotoxina S6c, não foi detectada dessensibilização significativa aos efeitos contráteis do próprio peptídeo ou da endotelina-1 ($P > 0.05$).

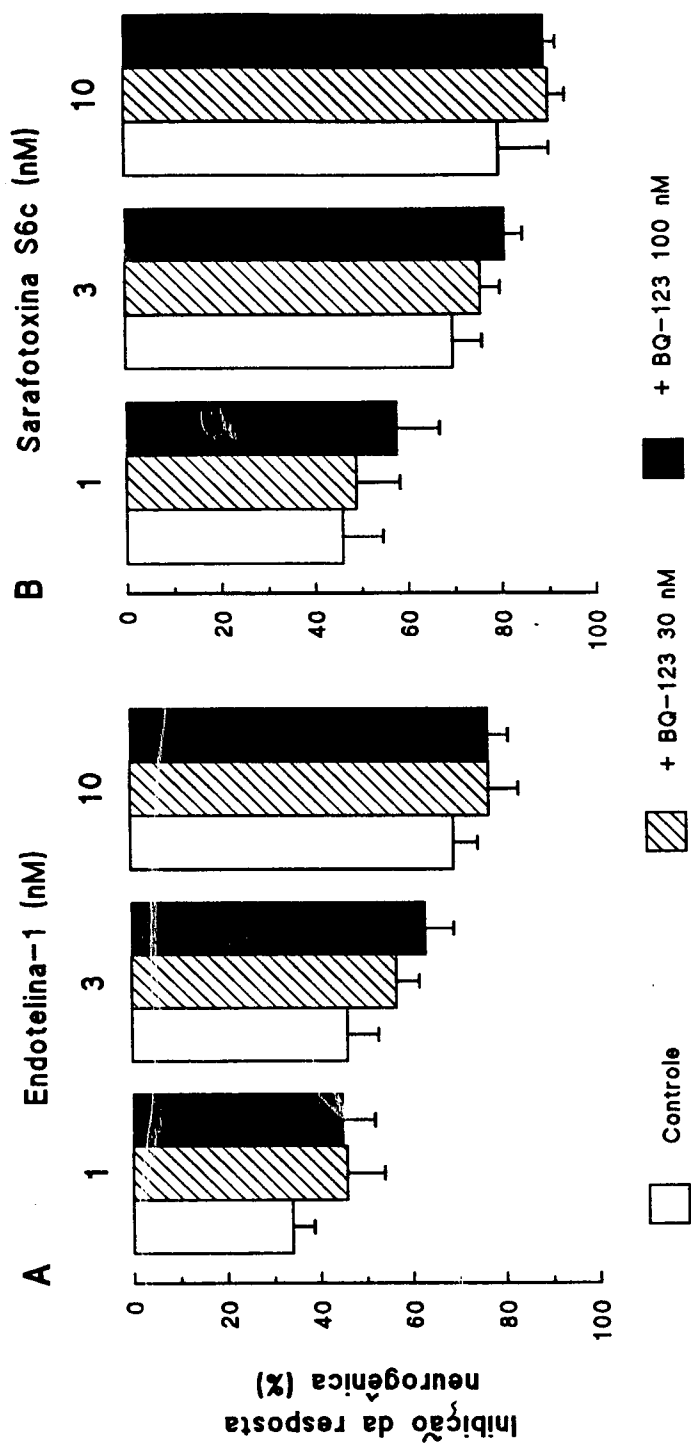


FIGURA 5 - Comparação dos efeitos inibitórios da endotelina-1 (A) e da sarafotoxina S6c (B) nas contrações neurogênicas do íleo isolado de cobaia estimulado eletricamente (0,1 Hz), na ausência ou na presença de 30 ou 100 nM de BQ-123. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 observações.

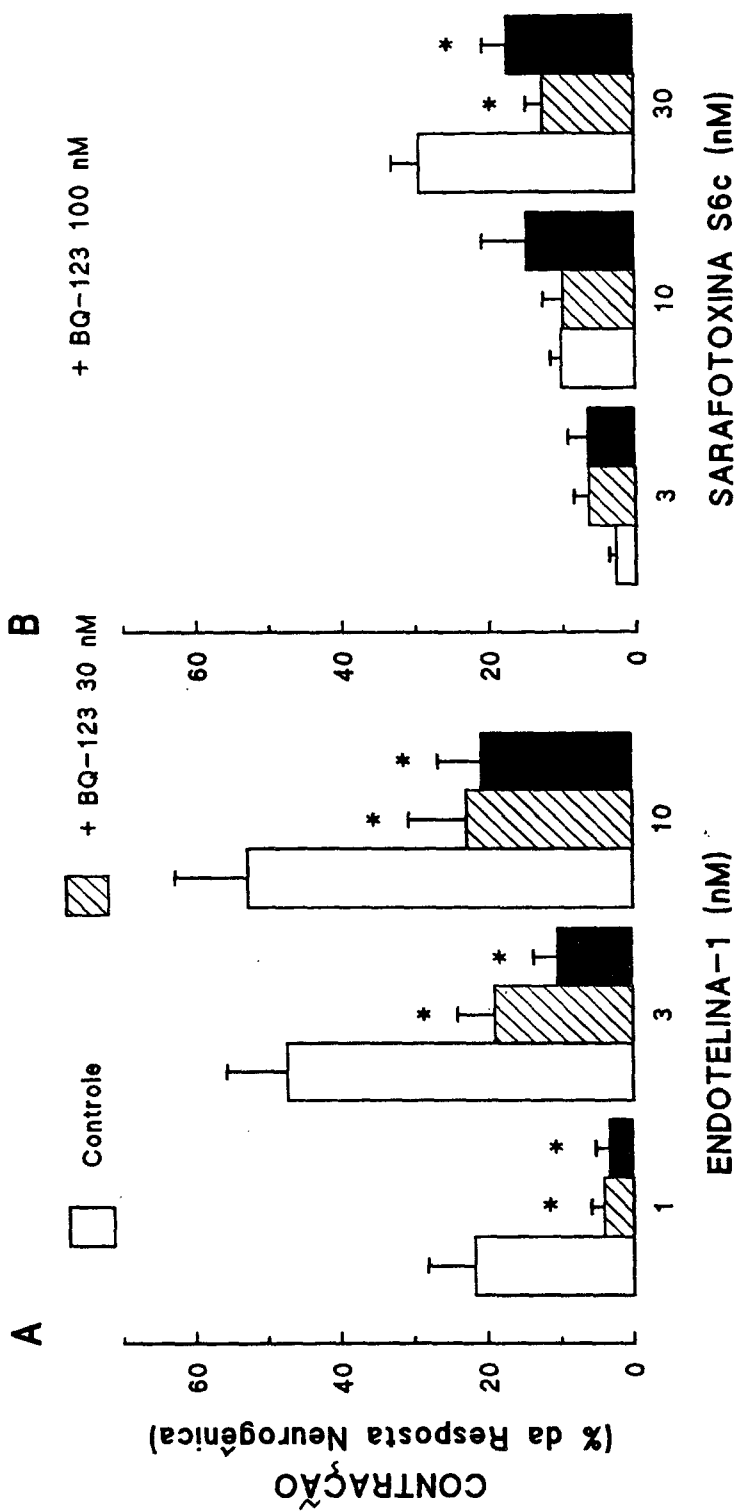


FIGURA 6 - Comparação dos efeitos contráteis da endotelina-1 (A) e da sarafotoxina S6c (B) no fêeo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo a 0,1 Hz, na ausência ou na presença de 30 ou 100 nM de BQ-123. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 observações.

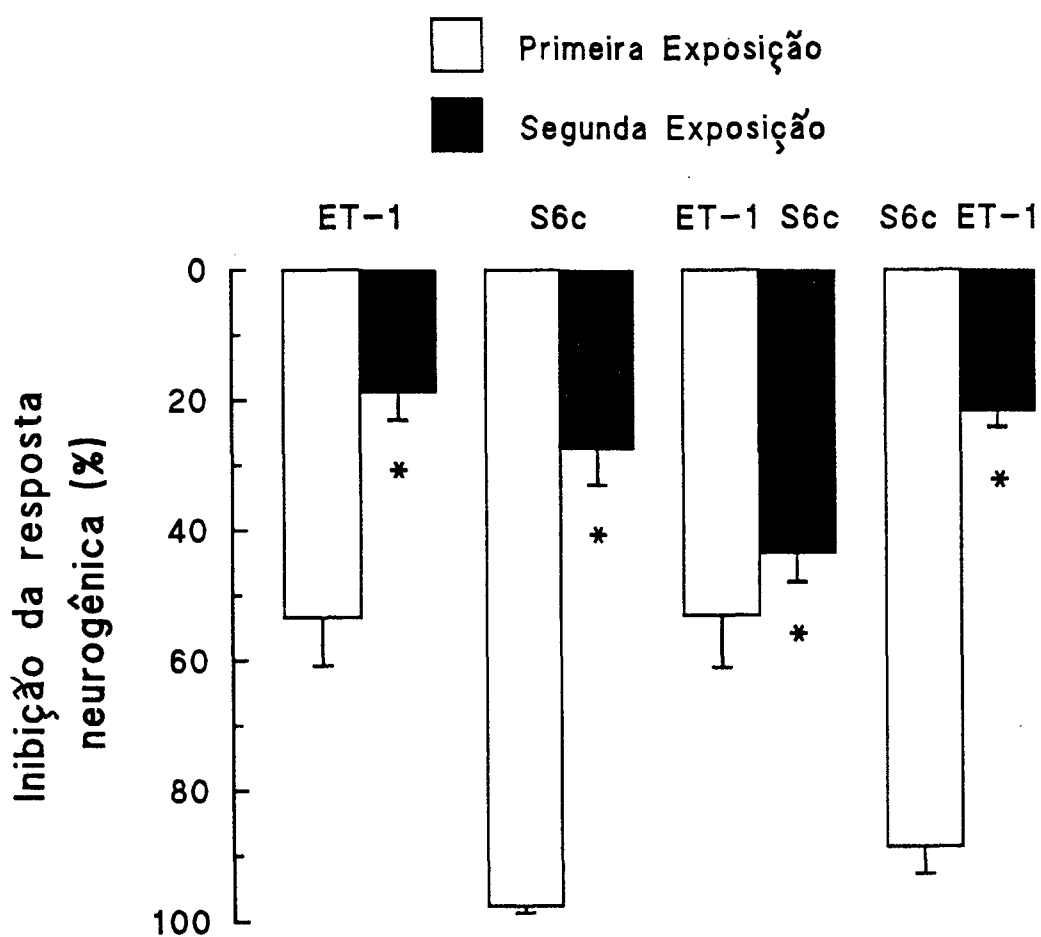


FIGURA 7 - Inibição das respostas neurogênicas do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica a 0,1 Hz induzida por duas exposições sucessivas da preparação à endotelina-1 (ET-1; 3 nM) e/ou sarafotoxina S6c (S6c; 10 nM), por 10 min a um intervalo de 30 min. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 observações. Asteriscos denotam $P < 0.05$ em relação ao efeito produzido pela primeira exposição ao próprio agonista.

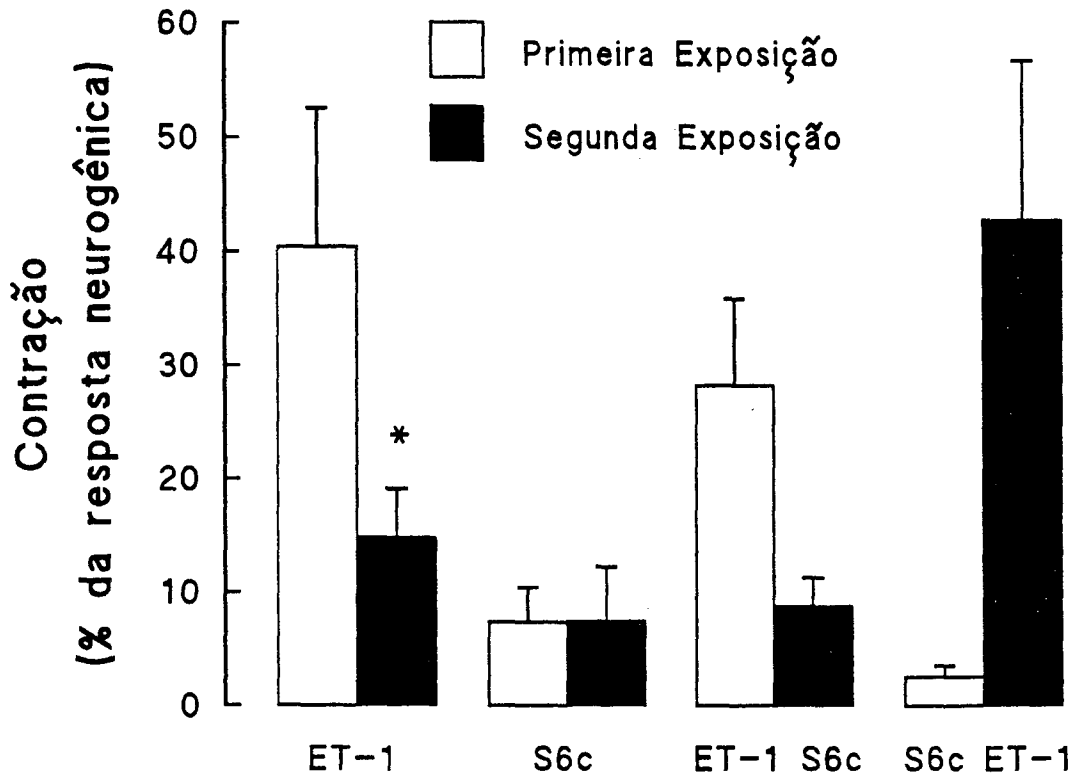


FIGURA 8 - Contração do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica a 0,1 Hz induzida por duas exposições sucessivas da preparação à endotelina-1 (ET-1; 3 nM) e/ou sarafotoxina S6c (S6c; 10 nM), por 10 min a um intervalo de 30 min. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 observações. O asterisco denota $P < 0.05$ em relação ao efeito produzido pela primeira exposição ao agonista.

4.5 - Mecanismos de ação da endotelina-1 no fêo

O agonista de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, o Bay K 8644, apresentou um perfil de atividade distinto do das endotelinas. Embora tanto o Bay K 8644 quanto a endotelina-1 tenham causado contração, ao contrário desta última, o Bay K 8644 potencializou de forma concentração-dependente e discreta as respostas neurogênicas do fêo de cobaia (figura 9).

A tabela 2 resume os resultados de vários experimentos que procuraram avaliar as influências de diversas drogas sobre o efeito bifásico da endotelina-1 (3 nM) no fêo de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo. Preparações expostas à tetrodotoxina (0,3 μ M) apresentaram redução pronunciada das respostas neurogênicas ($96 \pm 1,7$ %; $P < 0.05$). No entanto, a adição de endotelina-1, em presença do bloqueador de canais de sódio voltagem-dependentes, aboliu as respostas neurogênicas tetrodotoxina-resistentes e induziu uma contração semelhante à de preparações controle. Resultados semelhantes foram obtidos em preparações expostas à endotelina-1 na presença do antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos atropina (0,3 μ M). Por outro lado, a pré-incubação da preparação com indometacina (5,6 μ M) causou inibição discreta das respostas neurogênicas basais ($16,9 \pm 4,5$ %; $P < 0.05$) e reduziu a contração induzida pela endotelina-1 ($P < 0.05$), mas não afetou a ação inibitória do peptídeo.

A pré-incubação com nicardipina (0,1 μ M) inibiu parcialmente as respostas neurogênicas basais ($P < 0.05$) sem, contudo, afetar o efeito inibitório da endotelina-1 sobre as respostas resistentes ao antagonista de canais de cálcio do tipo L ($P > 0.05$). Convém destacar, porém, que a diidropiridina quase aboliu o desenvolvimento da contração induzida pela endotelina-1 ($P < 0.05$; tabela 2).

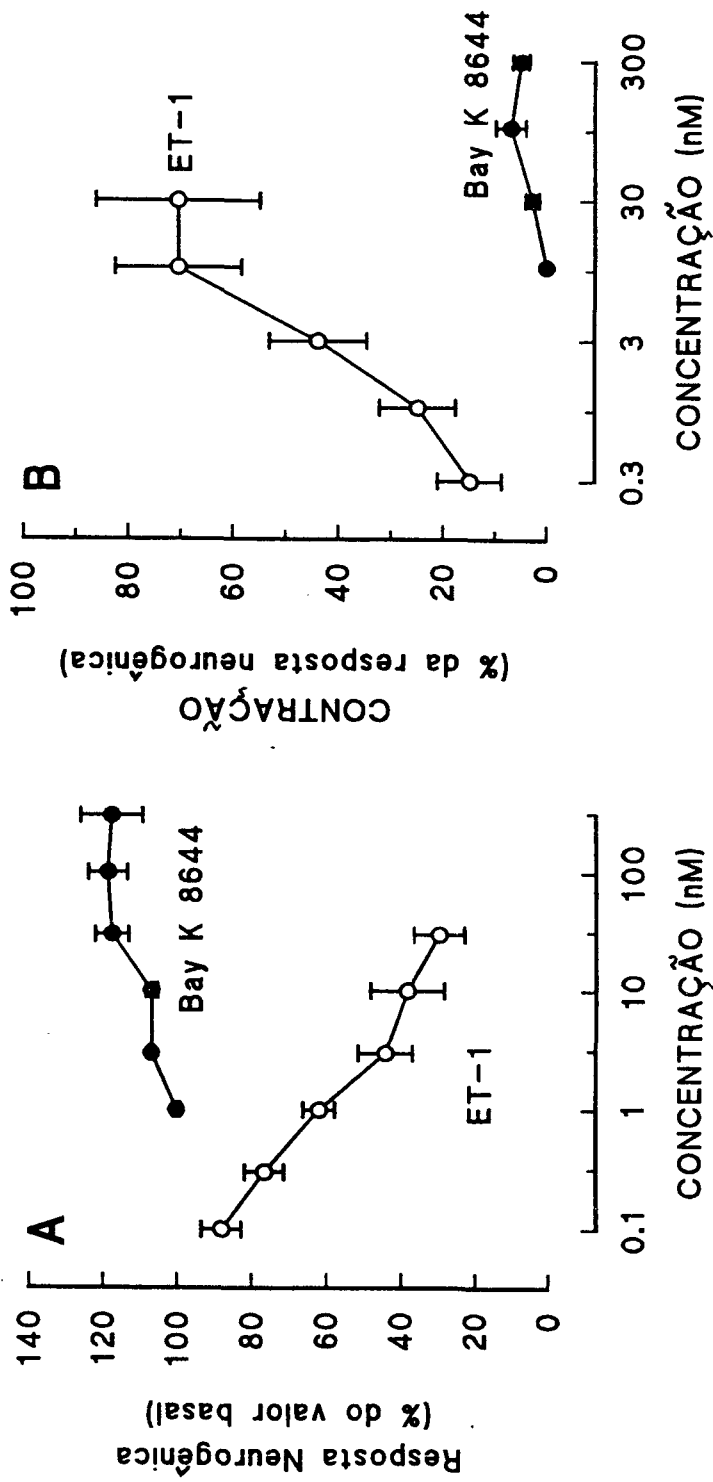


FIGURA 9 - Comparação dos efeitos da endotelina-1 (ET-1) e do Bay K 8644 sobre as respostas neurogênicas (A) e o tónus (B) do íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo a 0,1 Hz. Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos.

Tabela 2 - Influência da pré-incubação com tetrodotoxina (TTX), atropina (ATR), indometacina (INDO), nicardipina (NIC), cromacalina (CKL) ou glibenclamida (GBC) sobre os efeitos da endotelina-1 (3 nM) no íleo de cobaia submetido a estimulação elétrica de campo. O efeito inibitório da endotelina-1 é apresentado como porcentagem de redução das contrações evocadas imediatamente antes da sua adição. A contração induzida pela endotelina-1 é apresentada como porcentagem da contração neurogênica basal, antes da pré-incubação. Cada valor representa a média \pm E.P.M..

CONDIÇÃO	N ^a	% DEPRESSÃO DAS RESPOSTAS NEUROGÊNICAS PELA CONDIÇÃO	EFEITOS DA ENDOTELINA-1	
			INIBIÇÃO DAS RESPOSTAS NEUROGÊNICAS (%)	CONTRAÇÃO
CONTROLE	52 ^b	Nenhuma	50,9 \pm 2,7	40,6 \pm 2,5
+ TTX 0,3 μ M	6	96,0 \pm 1,7*	100,0 \pm 0,0 [#]	34,1 \pm 3,0
+ ATR 0,3 μ M	5	94,0 \pm 1,5*	100,0 \pm 0,0 [#]	51,3 \pm 10,8
+ INDO 5,6 μ M	8	16,9 \pm 4,5*	49,5 \pm 6,6	25,6 \pm 3,6 [#]
+ NIC 0,1 μ M	7	56,2 \pm 3,9*	35,6 \pm 8,9	3,4 \pm 1,0 [#]
+ CKL 10 μ M	9	68,2 \pm 5,6*	53,6 \pm 13,9	13,4 \pm 5,3 [#]
+ GBC 3 μ M	4	3,9 \pm 0,8	38,6 \pm 6,7	35,6 \pm 7,5

^a Número de observações.

^b Resultados de 6 grupos controles paralelos foram agrupados, pois não diferiram entre si quanto suas reatividades à endotelina-1 (ANOVA).

* P < 0.05 em relação às contrações neurogênicas basais verificadas antes da condição (teste "t" de Student para amostras pareadas).

P < 0.05 em relação à resposta do grupo controle correspondente (teste "t" de Student para amostras não pareadas).

Os registros experimentais típicos ilustrados na figura 10 demonstram que a nicardipina não apenas previniu o desenvolvimento da contração, como foi capaz de relaxar, prontamente, a preparação pré-contraída com a endotelina-1.

A exposição das preparações à cromacalina ($10 \mu\text{M}$) reduziu as respostas neurogênicas basais e a contração induzida pela endotelina-1 ($P < 0.05$; tabela 2 e figura 11). Porém, esse ativador de canais de potássio ATP-dependentes não modificou o efeito da endotelina-1 sobre as respostas neurogênicas remanescentes ($P > 0.05$).

Por outro lado, a glibenclamida ($3 \mu\text{M}$), que em outras preparações antagonizou marcadamente os efeitos da cromacalina ($10 \mu\text{M}$) de $64,2 \pm 4,0 \%$ para $10,0 \pm 2,1 \%$ ($P < 0.05$; $N = 5$), não influenciou a reatividade da preparação à endotelina-1 ($P > 0.05$; tabela 2). Além disso, como ilustra a figura 11, a cromacalina ($10 \mu\text{M}$) causou pronto relaxamento de fragmentos de íleo pré-contraídos com endotelina-1 (3 nM), sendo que esse efeito foi rapidamente revertido pela administração subsequente de glibenclamida ($3 \mu\text{M}$).

Tanto a acetilcolina (30 nM), quanto a histamina (100 nM), a bradicinina (10 nM) ou a substância P (1 nM) causaram contrações reproduzíveis em preparações não-estimuladas, quando administradas repetidamente a intervalos de 20 min. A adição de endotelina-1 ($0,3$ a 30 nM) à preparação, 5 min antes da segunda exposição a qualquer um dos agonistas, não provocou qualquer alteração das respostas contráteis ($P > 0.05$; tabela 3). Convém ressaltar que, ao contrário do que foi observado em fragmentos submetidos à estimulação elétrica, a endotelina-1 causou relaxamento discreto nas preparações não estimuladas eletricamente sob tônus normal de $0,5 \text{ g}$ (de $2,6 \pm 0,9\%$, $6,8 \pm 1,7\%$ e $6,4 \pm 1,1\%$ nas concentrações de $0,3$, 3 e 30 nM , respectivamente; $N = 4$ a 6).

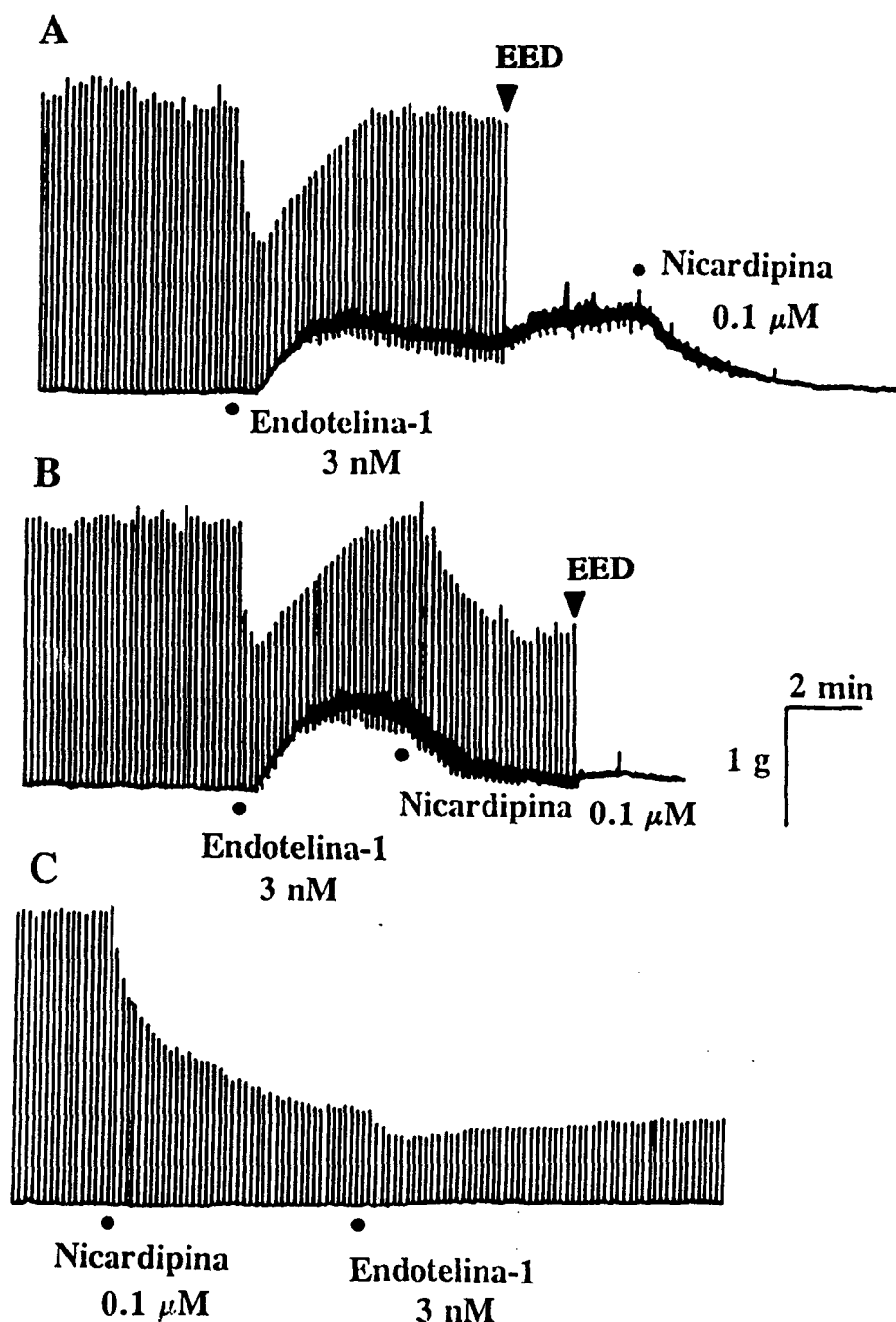


FIGURA 10 - Registros isométricos típicos mostrando os efeitos da nicardipina sobre a resposta bifásica do fleo isolado de cobaia à endotelina-1. A adição de nicardipina às preparações pré-contraídas com endotelina-1 reduziu o tóuns na ausência (A) ou na presença de estimulação elétrica de campo a 0,1 Hz (B). O registro "C" mostra que a adição de nicardipina antes da adição de endotelina-1 inibiu as respostas neurogênicas basais e o desenvolvimento da contração por endotelina-1, sem, no entanto, afetar a inibição das respostas neurogênicas induzidas pelo peptídeo. Registros similares foram observados em pelo menos 6 outros experimentos.

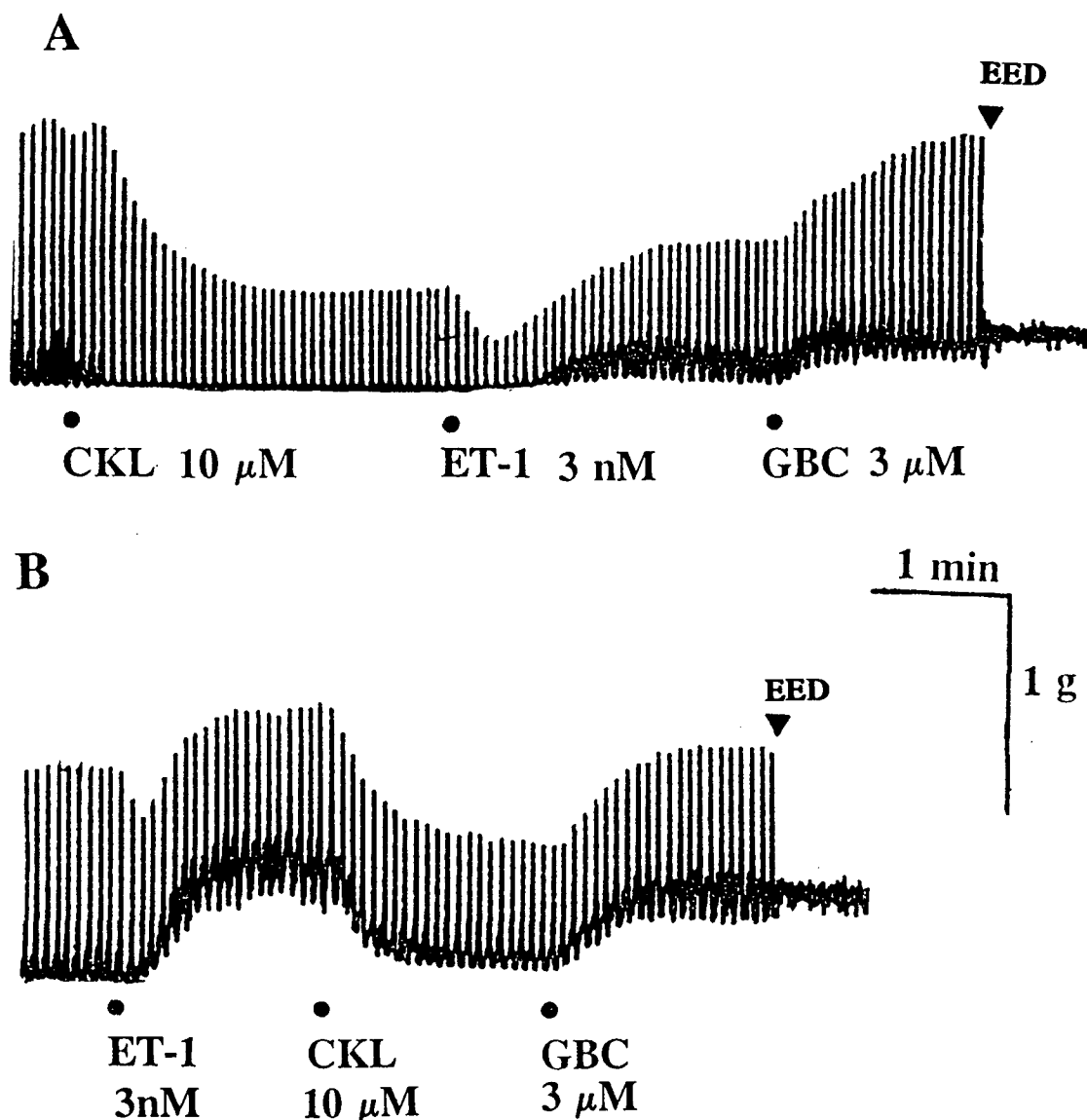


FIGURA 11 - Registros isométricos mostrando a influência da cromacalina (CKL) e da glibenclamida (GBC) sobre a resposta bifásica induzida pela endotelina-1 (ET-1) no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo a 0,1 Hz. No registro "A" observa-se que a CKL somente afetou a resposta contrátil induzida pela ET-1, sendo essa ação revertida pela adição de GBC. No registro "B", a exposição da preparação sob ao CKL reduziu o tônus basal e a contração induzida pelo peptídeo, sendo ambos os efeitos revertidos pela GBC. Registros similares foram obtidos em pelo menos outros 4 experimentos.

Tabela 3 - Influência da endotelina-1 (ET-1) nas contrações induzidas pela acetilcolina (ACh), histamina (HIS), bradicinina (BK) ou substância P (SP) no fêlo isolado de cobaia, na ausência de estimulação elétrica de campo. As contrações são apresentadas como porcentagens das respostas à estimulação elétrica prévia a 0,1 Hz. As respostas aos agonistas na presença da endotelina-1 (+ ET-1) representam aumentos de tensão acima daquela determinada pelo peptídeo. A endotelina-1 foi adicionada 5 min antes do agonista. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 4 a 6 observações.

AGONISTA	CONDIÇÃO	CONTRAÇÃO		
		ET-1 (0,3 nM)	ET-2 (3 nM)	ET-3 (30 nM)
ACh(30 nM)	Controle	66,2 \pm 12,2	61,6 \pm 4,4	61,2 \pm 4,8
	+ ET-1	75,2 \pm 10,7	67,3 \pm 6,2	75,7 \pm 8,0
His(100 nM)	Controle	70,3 \pm 8,7	65,4 \pm 8,5	74,4 \pm 5,9
	+ ET-1	68,7 \pm 13,8	75,8 \pm 9,9	83,1 \pm 15,7
BK (10 nM)	Controle	81,7 \pm 2,9	72,6 \pm 11,0	76,8 \pm 10,9
	+ ET-1	88,2 \pm 6,3	76,3 \pm 9,0	77,0 \pm 8,6
SP (1 nM)	Controle	45,8 \pm 9,9	49,2 \pm 11,0	41,9 \pm 7,7
	+ ET-1	43,4 \pm 7,8	44,8 \pm 8,1	43,4 \pm 7,0

Nenhum valor obtido em presença de endotelina-1 diferiu significativamente do respectivo grupo controle ($P > 0.05$, teste "t" de Student para amostras pareadas).

Preparações expostas a concentrações mais altas de acetilcolina (300 nM) ou histamina (1 μ M) desenvolveram, na ausência de estimulação elétrica, contrações fásicas de $3,03 \pm 0,17$ g e $3,05 \pm 0,22$ g, que foram seguidas de contrações sustentadas de $2,39 \pm 0,23$ g e $2,03 \pm 0,15$ g, respectivamente (N = 8 a 10). As contrações sustentadas induzidas pelos agonistas foram de magnitudes semelhantes às produzidas por estimulação elétrica ($1,96 \pm 0,06$ g, N = 150). A adição de endotelina-3 (3 ou 30 nM), após 10 min, causou um relaxamento transiente da preparação pré-contraída com acetilcolina ($10,2 \pm 4,1\%$ e $26,8 \pm 4,5\%$, respectivamente; $P < 0.05$; N = 5) ou com HIS ($18,2 \pm 10,1\%$ e $39,0 \pm 8,7\%$, respectivamente; $P < 0.05$; N = 4).

O tratamento com a toxina da *Bordetella pertussis* (50 μ g/kg, i.p.), 6 dias antes do sacrifício, não modificou a magnitude das respostas neurogênicas do fêto de cobaia. Os segmentos dos animais tratados com a toxina desenvolveram contrações de $2,03 \pm 0,09$ g (N = 15), enquanto os obtidos de cobaias tratadas com salina responderam à estimulação elétrica com contrações de $1,91 \pm 0,17$ g (N = 15). Como ilustra a figura 12 (A e B), o tratamento com a toxina não modificou de forma significativa quaisquer dos componentes do efeito bifásico da endotelina-1 (1 a 30 nM; $P > 0.05$). No entanto, as preparações obtidas de animais tratados com toxina de *Bordetella pertussis* foram significativamente menos sensíveis à inibição das respostas neurogênicas pela morfina ($P < 0.05$), confirmando assim a eficácia do tratamento em inativar proteínas G_i e/ou G_o (figura 13).

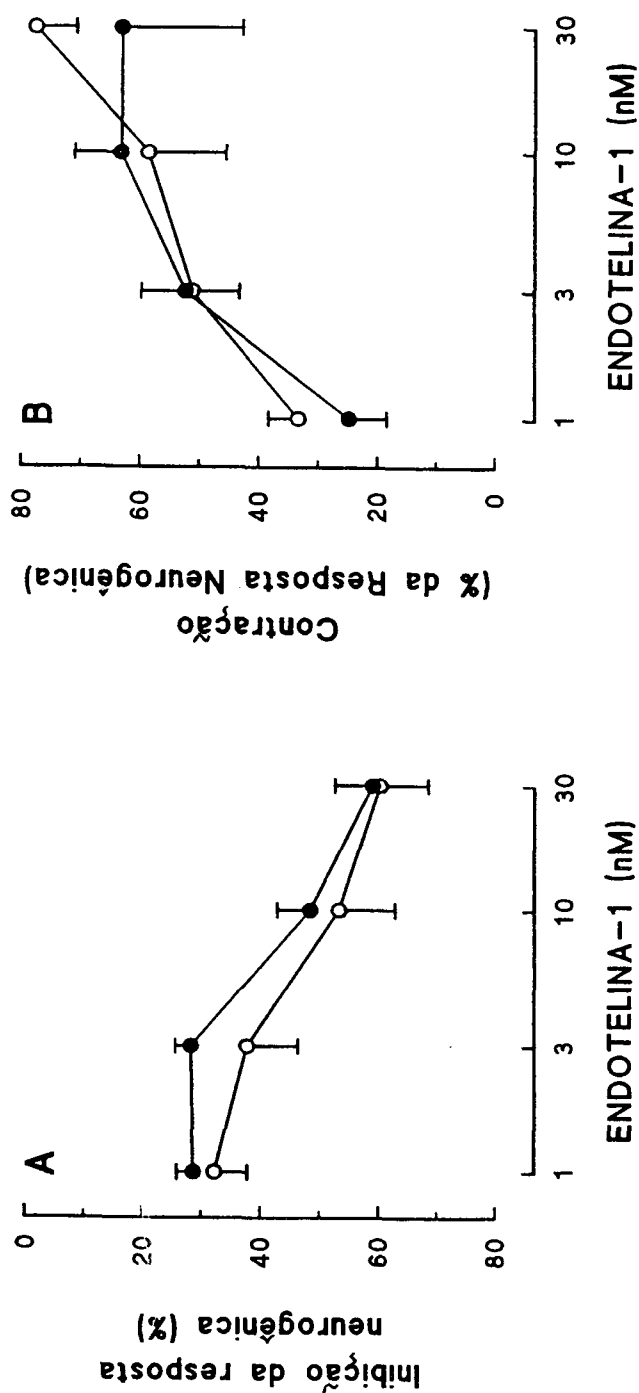


FIGURA 12 - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos da endotelina-1 em preparações de fêo isolado de cobaia estimulado eletricamente, controle (símbolos abertos), ou de animais tratados (símbolos fechados), 6 dias antes, com 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.) de toxina de *Bordetella pertussis*. Os painéis "A" e "B" apresentam resultados referentes à depressão das respostas neurogênicas e ao efeito contrátil do agonista, respectivamente. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 3 experimentos.

5 - DISCUSSÃO

O presente estudo confirma que a endotelina-1 induz efeito bifásico no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo, caracterizado por depressão transiente das respostas neurôgenicas seguida por contração sustentada da preparação (Hiley *et al.*, 1989; Maggi *et al.*, 1989d; Wiklund *et al.*, 1989a,b; Miller *et al.*, 1990; Miasiro & Paiva, 1990; Warner *et al.*, 1993b). Ambos os componentes do efeito da endotelina-1 foram concentração-dependentes, desde que cada concentração do peptídeo fosse administrada a segmentos distintos de íleo de um mesmo animal. Tentativas para a obtenção de curvas concentração-efeito cumulativas ou não-cumulativas (por adições de concentrações isoladas crescentes a intervalos de 20-30 min) foram infrutíferas, devido ao desenvolvimento de dessensibilização rápida e pronunciada. Talvez esse fato explique porque Borges *et al.* (1989) não observaram qualquer efeito contrátil da endotelina-1 no íleo, e Maggi *et al.* (1989d) relataram uma inibição tão discreta das respostas neurogênicas pelo peptídeo.

Embora a endotelina-2 e a endotelina-3 tenham apresentado perfis de ação qualitativamente semelhantes ao da endotelina-1 no íleo, foram detectadas diferenças quantitativas marcantes entre os efeitos dos três peptídeos. A ordem de potências relativas das endotelinas para a inibição transiente das respostas neurogênicas (CI_{50} em concentrações molares) foi endotelina-3 = endotelina-1 > endotelina-2, sendo que a resposta inibitória máxima à endotelina-3 foi significativamente maior que aquelas à endotelina-1 e à endotelina-2. Esses achados são muito semelhantes aos obtidos em pelos menos dois estudos na mesma preparação, o primeiro comparando as atividades das três endotelinas (Maggi *et al.*, 1989d) e o segundo apenas as da endotelina-1 e endotelina-3 (Warner *et al.*, 1993b).

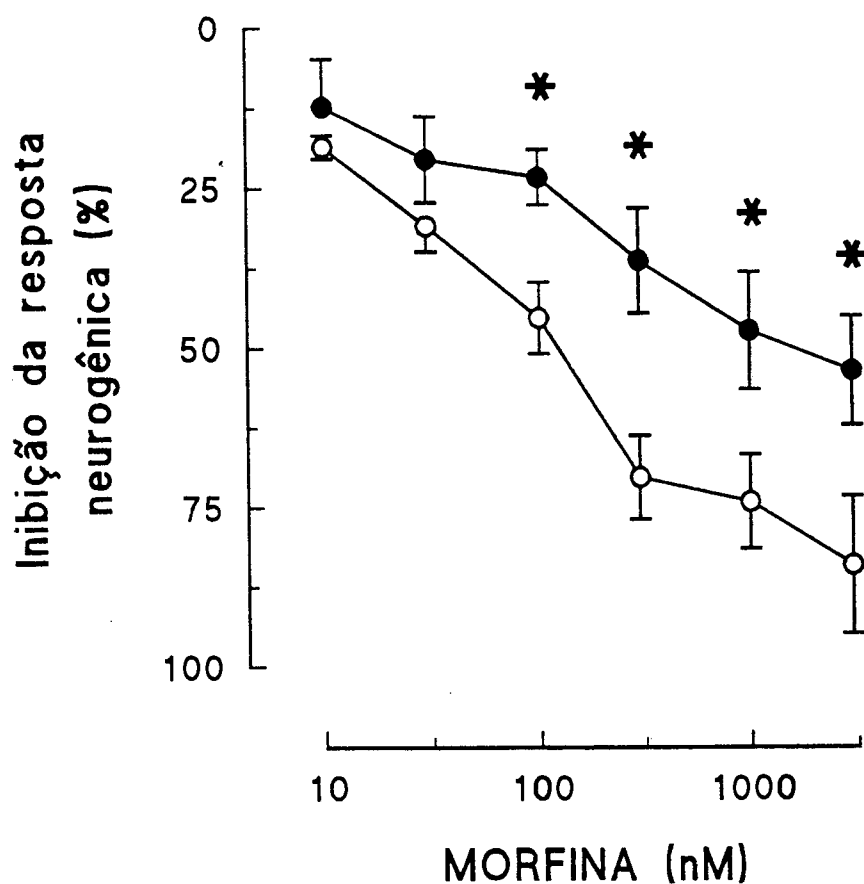


FIGURA 13 - Curvas concentração-efeito médias para os efeitos inibitórios da morfina sobre as respostas neurogênicas do íleo estimulado eletricamente isolado de cobaia, controle (símbolos abertos), ou tratadas (símbolos fechados) 6 dias antes, com 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.) de toxina de *Bordetella pertussis*. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 3 experimentos. Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação ao respectivo valor controle.

Por outro lado, o presente estudo evidenciou que a endotelina-1 e a endotelina-2 foram equipotentes entre si e mais potentes que a endotelina-3 para induzirem contração, como indicam as CE_{50} calculadas para cada peptídeo. Além disso, a contração máxima causada pela endotelina-1 foi significativamente maior que a verificada em resposta à endotelina-2 ou à endotelina-3. Tais resultados alinham-se àqueles relatados por Spokes *et al.* (1989), Wiklund *et al.* (1991), Lin & Lee (1992), Miasiro & Paiva (1993) e Warner *et al.* (1993b).

A demonstração de ordens de potências relativas diferentes para cada componente de ação das endotelinas pode ser tomada como evidência preliminar de que os receptores envolvidos nessas duas respostas do fêlo são distintos. No entanto, como comenta Kenakin (1993), uma caracterização mais adequada sobre a heterogeneidade de receptores requer a utilização de agonistas mais seletivos e, principalmente, de antagonistas competitivos. Nesse sentido, constatamos no presente estudo que a sarafotoxina S6c, um agonista seletivo de receptores ET_B (Huggins *et al.*, 1993), foi tão potente quanto a endotelina-1 (e a endotelina-3) em inibir as contrações neurogênicas do fêlo. No entanto, o agonista seletivo do receptor ET_B foi cerca de 30 a 100 vezes menos potente que a endotelina-1 em contrair a preparação. Além disso, o antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123 (Ihara *et al.*, 1992) não modificou os efeitos depressores da endotelina-1 ou da sarafotoxina S6c sobre as respostas à estimulação elétrica. Porém, inibiu marcadamente as contrações sustentadas causadas pela endotelina-1 e, de forma menos pronunciada, pela maior concentração (30 nM) de sarafotoxina S6c. Assim, os resultados obtidos com a sarafotoxina S6c e o BQ-123 reforçam a hipótese de que o efeito bifásico da endotelina-1 no fêlo decorre da ativação de receptores distintos.

Conforme foi mencionado na introdução, há pelo menos três receptores para as

endotelinas bem caracterizados (Huggins *et al.*, 1993; Regoli *et al.*, 1993). O primeiro tipo é o receptor ET_A, que apresenta maior afinidade à endotelina-1 e à endotelina-2 do que à endotelina-3, e é sensível a bloqueio por baixas concentrações de BQ-123. O segundo é o receptor ET_B, que apresenta afinidades semelhantes às três endotelinas, é bloqueado pelo IRL-1038 mas é resistente ao bloqueio pelo BQ-123, e pode ser ativado seletivamente por sarafotoxina S6c, IRL 1620 e BQ-3020. O terceiro tipo é o receptor ET_C, que apresenta afinidade muito maior para a endotelina-3 do que para as demais endotelinas.

As potências semelhantes da endotelina-1 e da endotelina-3 para inibição das contrações neurogênicas do íleo, sugerem que esse efeito seja mediado por receptores ET_B. Esta hipótese é reforçada pela atividade pronunciada da sarafotoxina S6c para causar o mesmo efeito, bem como pela ausência de antagonismo dos efeitos depressores da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c pelo BQ-123. Além disso, a exposição prévia das preparações à endotelina-1 ou à sarafotoxina S6c determinou tolerância homóloga e cruzada aos efeitos inibitórios de ambos os peptídeos. Isso também sugere que os efeitos desses dois peptídeos são mediados por ativação de uma população homogênea de receptores ET_B.

Entretanto, algumas evidências não se alinham a essa conclusão. A endotelina-2 foi cerca de 7 vezes menos potente que a endotelina-1 na indução do efeito contrátil, mas talvez essa discrepância possa ser explicada pela impossibilidade de determinar a potência desse peptídeo em condições adequadas de equilíbrio (Kenakin, 1993). Warner *et al.* (1993b) observaram que a inibição das respostas neurogênicas do íleo de cobaia pela sarafotoxina S6c foi antagonizada, ainda que discretamente, pelo BQ-123. Porém, considerando que os autores utilizaram uma concentração extremamente elevada do antagonista (10 μ M), parece provável que o resultado reflita mais a seletividade limitada

do antagonista do que a ativação de receptores ET_A pelo agonista.

Maggi *et al.* (1989a) demonstraram que o fragmento endotelina-1 (16-21), considerado um agonista seletivo de receptores ET_B (Maggi *et al.*, 1989d), não afetou as respostas do íleo de cobaia à estimulação elétrica. Curiosamente, Tschirhart *et al.* (1991) observaram que o fragmento contraía a traquéia de cobaia, mas não competia com a endotelina-1 pela ocupação de sítios de ligação específicos em membranas deste tecido. Os autores sugeriram que o efeito da endotelina-1 (16-21) na traquéia não envolveu a ativação de receptores típicos para endotelinas. Por outro lado, a ausência de efeito inibitório da endotelina-1 (16-21) sobre as respostas do íleo à estimulação elétrica poderia sugerir que esse tecido contenha um subtipo de receptor ET_B insensível ao fragmento. Neste particular, o antagonista não-seletivo de receptores ET_A e ET_B PD 142893, que bloqueia a vasodilatação do mesentério arterial perfundido de rato mediada por receptores ET_B (Warner *et al.*, 1993a), não afeta a depressão das respostas neurogênicas do íleo de cobaia pela endotelina-1 (Warner *et al.*, 1993b). Assim, há evidências consideráveis de que existam subtipos de receptores ET_B .

A natureza dos receptores envolvidos nos efeitos contráteis das endotelinas no íleo de cobaia parece mais elusiva. Embora a endotelina-3 tenha-se apresentado significativamente menos potente que a endotelina-1 e a endotelina-2 em contrair a preparação, a diferença entre as CE_{50} foi de apenas 3,5 vezes. Achados semelhantes foram relatados por Spokes *et al.* (1989), Wiklund *et al.* (1991), Wollberg *et al.* (1991), Lin & Lee (1992), Miasiro & Paiva (1992) e Warner *et al.* (1993b), que também observaram uma potência da endotelina-3 de 4 a 30 vezes menor que a da endotelina-1 em contrair segmentos de íleo de cobaia. Ainda, Yoshinaga *et al.* (1992) verificaram que a potência da endotelina-

3 em contrair a musculatura longitudinal do íleo de cobaia não diferia daquelas apresentadas pela endotelina-1, endotelina-2 e VIC. Considerando que a afinidade da endotelina-3 por receptores ET_A é cerca de 100 vezes menor que a da endotelina-1 (Arai *et al.*, 1990; Rae & Calixto, 1993; Sakamoto *et al.*, 1993), a diferença discreta entre as potências de ambos os peptídeos, evidenciada no presente estudo, sugere que os seus efeitos contráteis não sejam mediados por uma população homogênea de receptores ET_A típicos. No entanto, a exemplo dos achados de Warner *et al.* (1993b), verificou-se no presente estudo que o antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123 inibiu as contrações induzidas pela endotelina-1 e por uma concentração mais elevada (30 nM) de sarafotoxina S6c. Esses resultados sugerem, portanto, que pelo menos parte do efeito contrátil da endotelina-1 no íleo decorre da ativação de receptores ET_A .

Por outro lado, o BQ-123 não afetou as contrações induzidas por baixas concentrações de sarafotoxina S6c, como também não bloqueou as ações da endotelina-1 de forma nitidamente concentração-dependente. Além disso, ao contrário do que se verificou com relação à inibição das respostas neurogênicas, não foi observada dessensibilização cruzada entre os efeitos contráteis da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c. De forma semelhante, Miasiro & Paiva (1992) observaram que o íleo de cobaia exposto à endotelina-3 não desenvolvia dessensibilização cruzada ao efeito contrátil da endotelina-1, embora as preparações exibissem redução da contração induzida pela própria endotelina-3. Em vista do exposto, parece plausível propor que parte dos receptores responsáveis pelos efeitos contráteis das endotelinas na preparação sejam do tipo ET_B . Essa proposição é reforçada pela constatação de que o fragmento endotelina-1 (16-21) também contrai o íleo de cobaia (Maggi *et al.*, 1989d; Miasiro *et al.*, 1993), embora pelo menos parte dessa

contração seja sensível ao bloqueio pelo BQ-123 (Miasiro *et al.*, 1993).

Apesar das evidências funcionais acumuladas até o momento constituírem forte argumento para a co-existência de receptores ET_A e ET_B no fêo de cobaia, poucos estudos têm analisado esse aspecto através do uso de radioligantes. Embora já tenha sido demonstrado que a endotelina-1 associa-se a sítios de ligação de alta afinidade em membranas de fêo de rato (Bolger *et al.*, 1990) e cobaia (Bolger *et al.*, 1992), outro estudo demonstrou, através do emprego de métodos autorradiográficos, a presença de sítios de ligação para a endotelina-1 nas musculaturas circular e longitudinal do fêo de rato (Takahashi *et al.*, 1990). No entanto, nenhum desses estudos fez uso de outras endotelinas ou sarafotoxinas nos experimentos de competição, o que teria permitido identificar os possíveis tipos de receptores marcados pela [¹²⁵I]-endotelina-1 no fêo. Por outro lado, Wollberg *et al.* (1991) observaram que a ligação de [¹²⁵I]-sarafotoxina S6b a sítios específicos de ligação em membranas de fêo de cobaia foi inibida igualmente pela endotelina-1, endotelina-3, VIC e sarafotoxina S6b. A discrepância entre estes achados e os resultados dos estudos funcionais poderia indicar uma prevalência de receptores ET_B sobre receptores ET_A no fêo de cobaia. Porém, tal possibilidade merece ser melhor investigada através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos para cada um dos tipos de receptor.

Parte do presente estudo procurou caracterizar alguns dos possíveis mecanismos celulares pelos quais as endotelinas reduzem a magnitude das contrações neurogênicas do fêo de cobaia. Nesse sentido, verificou-se que o efeito depressor da endotelina-1 não foi influenciado por indometacina. Assim, a manifestação desse efeito da endotelina-1 parece ser independente da produção de eicosanóides da via da cicloxigenase. Em estudo

semelhante, Wiklund *et al.* (1991) também relataram que a redução das respostas neurogênicas pela endotelina-1 não foi modificada por indometacina ou BW 755C (um inibidor de lipoxigenase). Cumpre salientar que as endotelinas induzem a liberação de eicosanóides em diversos órgãos e tecidos, que por sua vez podem mediar e/ou modular as ações desses peptídeos (para uma revisão ver Hyslop & De Nucci, 1992). Recentemente, Fukunaga *et al.* (1993) demonstraram, no íleo de cobaia, que a indometacina diminui a liberação de acetilcolina induzida por substância P e nicotina, sugerindo que as prostaglandinas endógenas modulam a atividade de motoneurônios colinérgicos do plexo mioentérico.

Por outro lado, o efeito depressor da endotelina-1 também não foi influenciado pela glibenclamida, um bloqueador de canais de potássio ATP-dependentes, ou pela cromacalina, um ativador direto desses canais que inibe *per se* as contrações neurogênicas dessa preparação (Schwöerer & Kilbinger, 1989). Esses achados refutam a participação desses canais na mediação da depressão das respostas neurogênicas do íleo pela endotelina-1. No entanto, há evidências de que a endotelina-1 relaxa o íleo não-estimulado (Miasiro & Paiva, 1990) e a *taenia coli* (Usune *et al.*, 1991) isolados de cobaia por estimulação de canais de potássio ativados por cálcio e sensíveis à apamina. Ainda, a dilatação da artéria pulmonar de rato pelo peptídeo é inibida pela glibenclamida e pelo tetraetilamônio, indicando que o peptídeo possa ativar canais de potássio ATP-dependentes nesse tecido (Hasunuma *et al.*, 1990).

Ao contrário da endotelina-1 e demais endotelinas, o Bay K 8644, uma diidropiridina que ativa diretamente canais de cálcio do tipo "L" dependentes de voltagem, causou um aumento discreto das respostas do íleo à estimulação elétrica.

Também foi constatado que a nicardipina, um bloqueador desses canais, não interfere com a inibição das contrações neurogênicas pela endotelina-1, confirmando achados anteriores obtidos com a nifedipina (Miller *et al.*, 1990). Tais evidências descartam a mediação ou a modulação do efeito depressor das endotelinas através da ativação de canais de cálcio do tipo "L". Parece oportuno destacar que a depressão das respostas neurogênicas basais do íleo pela nicardipina envolve, possivelmente, o bloqueio de canais de cálcio do tipo "L" pré- e pós-juncionais (Martin *et al.*, 1990).

Infelizmente, por limitações técnicas do laboratório, não foi possível analisar a influência das endotelinas sobre a liberação de neurotransmissores. No entanto, Wiklund *et al.* (1989b, 1991) verificaram que a endotelina-1, em concentrações elevadas, inibiu a liberação de acetilcolina induzida por estimulação elétrica de campo do íleo de cobaia. Ao contrário, Taniyama *et al.* (1993) observaram que o VIC aumentou a liberação espontânea de acetilcolina na mesma preparação. Apesar da discrepância aparente entre esses achados, ambos sugerem que as endotelinas possam atuar diretamente sobre os motoneurônios colinérgicos. Além disso, é provável que a despolarização parcial das terminações nervosas colinérgicas pela endotelina-1 resulte em aumento da liberação espontânea do neurotransmissor e, simultaneamente, em redução da liberação induzida pela invasão das terminações pelo potencial de ação. Nesse sentido, pelo menos parte do efeito depressor das endotelinas sobre as contrações neurogênicas do íleo pode ser devida a uma ação pré-juncional sobre os motoneurônios colinérgicos ou outros neurônios mioentéricos. Por outro lado, considerando que a endotelina-3 também causou relaxamento transiente de preparações pré-contraídas por acetilcolina ou histamina, conclui-se que uma parte significativa da depressão das respostas neurogênicas pelas endotelinas é decorrente de uma

ação pós-juncional.

Segmentos de fêo de cobaia apresentam, na ausência de estimulação elétrica, um relaxamento transiente em resposta à endotelina-1 (Lin & Lee, 1990; 1992; Miasiro & Paiva, 1990, 1992; Miasiro *et al.*, 1993; Wollberg *et al.*, 1991). Esse efeito não é observado na preparação plexo mioentérico-musculatura longitudinal do fêo de cobaia (Sakata *et al.*, 1989; Bolger *et al.*, 1992), no fêo de camundongo (Ishida *et al.*, 1989) ou no fêo de rato (Takahashi *et al.*, 1990). Normalmente também não se manifesta no fêo de cobaia submetido a estimulação elétrica (presente estudo; Hiley *et al.*, 1989; Wiklund *et al.*, 1989a; Miller *et al.*, 1990; Warner *et al.*, 1993b).

Talvez a ausência de relaxamento nestas últimas preparações, em resposta à endotelina-1, decorra da queda do tônus causado pela própria estimulação elétrica, de modo a impedir qualquer relaxamento adicional da tensão basal. Nesse sentido, a depressão das contrações neurogênicas pela endotelina-1 poderia envolver os mesmos mecanismos responsáveis pelo relaxamento observado na ausência de estimulação. No entanto, existem algumas diferenças que sugerem que ambos os efeitos constituam fenômenos distintos. Ao contrário da depressão das respostas neurogênicas causadas pela endotelina-1, o relaxamento induzido pelo peptídeo não é concentração-dependente (Lin & Lee, 1990, 1992; Miasiro & Paiva, 1990, 1992; Miasiro *et al.*, 1993) e é atenuado pelo bloqueio de canais de cálcio do tipo "L" como o verapamil (Miasiro & Paiva, 1990). O relaxamento também é bloqueado pela apamina e pela atropina, é potencializado pela amilorida, mas não é alterado pela indometacina, naloxona, tolazolina, propranolol, metisergida, glibenclamida, difenidramina, guanetidina, tetrodotoxina, N^w-nitroarginina, azul de metileno, ouabaína, forbol éster ou peptídeo natriurético (Lin & Lee, 1990, 1992; Miasiro & Paiva, 1990, 1992).

A pré-incubação do íleo de cobaia com indometacina reduziu significativamente a contração induzida pela endotelina-1. Esse achado sugere, fortemente, que a contração seja mediada em parte e/ou modulada pela liberação de eicosanóides derivados da via da cicloxigenase. Há evidências que apontam as prostaglandinas como reguladoras da atividade contrátil da musculatura lisa do trato gastrintestinal, principalmente do intestino delgado, além de estimularem a neurotransmissão colinérgica (Eglen & Whiting, 1988; Staumont *et al.*, 1990). Destaca-se, ainda, que a prostaglandina $F_{2\alpha}$ e a prostaciclina aumentam o tônus do jejuno de cão (Radomirov *et al.*, 1983) e do íleo de cobaia (Gaion & Trento, 1983). A capacidade da endotelina-1 em estimular a síntese e liberação de prostaglandinas foi demonstrada em diversas preparações e *in vivo* (De Nucci *et al.*, 1988; Payne & Whittle, 1988; Rae *et al.*, 1989; para uma revisão ver Hyslop & De Nucci, 1992). Entretanto, como Miasiro & Paiva (1990) & Lin & Lee (1990) não detectaram modificação da contração induzida pela endotelina-1 no íleo de cobaia exposto à indometacina, a participação de eicosanóides nesse componente de ação das endotelinas permanece a ser melhor caracterizada.

A exemplo da endotelina-1, o ativador de canais de cálcio do tipo "L" Bay K 8644 causou contração, ainda que discreta, do íleo de cobaia. Além disso, a nicardipina, um bloqueador desses canais, praticamente aboliu tanto o desenvolvimento quanto a manutenção da contração induzida pela endotelina-1. Tais achados, que são semelhantes àqueles relatados por outros autores na mesma preparação (Hiley *et al.*, 1989; Ishida *et al.*, 1989; Lin & Lee, 1990; Miasiro & Paiva, 1990; Miller *et al.*, 1990; Sakata *et al.*, 1990; Bolger *et al.*, 1992; Yoshinaga *et al.*, 1992), indicam que esse efeito da endotelina-1 depende, fortemente, da ativação de canais "L" e influxo de cálcio a partir do meio extracelular.

Yanagisawa *et al.* (1988) sugeriram que a endotelina-1 consistiria em um ativador direto endógeno dos canais de cálcio "L". Porém, estudos subseqüentes demonstraram que a ativação desses canais pelo peptídeo é indireta (Goto *et al.*, 1989; Silberberg *et al.*, 1989; Van Renterghem *et al.*, 1988; Gu *et al.*, 1989a,b), e nem sempre é necessária para a produção de contração da musculatura lisa (D'Orleans-Juste *et al.*, 1989).

A musculatura lisa vascular contém canais de potássio dependentes de ATP que são ativados pela cromacalina para determinar hiperpolarização e vasodilatação sensíveis ao bloqueio pela glibenclamida (Standen *et al.*, 1989). Esses canais também ocorrem no fêo de cobaia, pois a cromacalina inibiu as respostas neurogênicas basais e a contração induzida pela endotelina-1, sendo que ambos os efeitos foram revertidos pela glibenclamida. Considerando que o relaxamento do fêo causado pela cromacalina decorre de hiperpolarização do músculo liso, já que ela não modifica a liberação neural de acetilcolina (Schwörer & Kilbinger, 1989), é provável que a endotelina-1 induza contração por despolarização e, conseqüentemente, ativação de canais de cálcio "L" voltagem-dependentes. Tal mecanismo de ação da endotelina-1 foi proposto para explicar resultados semelhantes obtidos na veia porta de rato (Guimarães *et al.*, 1992). Por outro lado, há evidências que a endotelina-1 possa inibir a atividade de canais de potássio ATP-dependentes nas artérias coronária de suíno e pulmonar de rato (Miyoshi *et al.*, 1992).

Embora não tenham sido realizados experimentos, no presente estudo, para caracterizar o acoplamento dos receptores de endotelina à fosfolipase C, alguns trabalhos sugerem que tal mecanismo é importante para a resposta contrátil do fêo às endotelinas. Assim, tanto o inibidor de proteína quinase C H-7 quanto o forbol éster, que ativa e depois desacopla esta enzima, inibem a contração do fêo de cobaia induzida pela endotelina-1

(Lin & Lee, 1990, 1992; Miasiro & Paiva, 1992). Esses resultados sugerem que a endotelina-1 estimula a fosfolipase C a formar diacilglicerol e inositol trifosfato a partir do fosfatidilinositol bifosfato. No entanto, estudos recentes em outros tecidos indicam que a endotelina-1 pode induzir a formação de diacilglicerol por uma via alternativa, através da ativação da fosfolipase D e conversão da fosfatidilcolina em ácido fosfatídico (MacNulty *et al.*, 1990; Ambar & Sokolovsky, 1993). Dessa forma, são necessários estudos adicionais para determinar se a contração do fêo de cobaia pelas endotelinas depende da ativação das fosfolipases C e/ou D.

A endotelina-1 não alterou as contrações do fêo de cobaia induzidas pela acetilcolina, histamina, bradicinina ou substância P. Dessa forma, parece pouco provável que parte do efeito contrátil da endotelina-1 seja mediado por uma potencialização das ações de neurotransmissores liberados pelos neurônios mioentéricos. Embora essa conclusão seja reforçada pelo estudo de Bolger *et al.* (1992), Wiklund *et al.* (1989a, 1991) demonstraram que a endotelina-1, em altas concentrações, aumenta significativamente as contrações do fêo induzidas pela acetilcolina. As razões para a contradição entre esses achados permanecem a ser esclarecidas.

O bloqueio da atividade neuronal com a tetrodotoxina ou com antagonistas de receptores colinérgicos muscarínicos, utilizando a atropina, não alterou a contração do fêo causada pela endotelina-1. Ambos os resultados indicam que a contração causada pelo peptídeo não foi mediada pela liberação neuronal de acetilcolina ou outro neurotransmissor excitatório. Alguns trabalhos confirmam a ausência de influência da tetrodotoxina e da atropina na contração induzida pela endotelina-1 nessa preparação (Lin & Lee, 1990; Bolger *et al.*, 1992). No entanto, outros autores têm descrito que a atropina reduziu a contração

induzida pela endotelina-1 (Miasiro & Paiva, 1990) ou pelo VIC (Taniyama *et al.*, 1993). Embora a tetrodotoxina não tenha afetado a contração induzida pela endotelina-1 (Miasiro & Paiva, 1990), ela reduziu aquelas induzidas por endotelina-3 (Miasiro & Paiva, 1992) e por VIC (Taniyama *et al.*, 1993). Considerando que a contração do íleo causado pelas endotelinas possivelmente envolve ativação dos receptores ET_A e ET_B (ver acima), é possível que a contração causada por ativação dos últimos receptores seja mediada por estimulação de motoneurônios colinérgicos.

Tanto os receptores ET_A quanto os ET_B pertencem à superfamília de receptores do tipo da rodopsina (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). São, portanto, proteínas que apresentam 7 domínios transmembrana acoplados aos seus sistemas efetadores através das proteínas G (Huggins *et al.*, 1993). As proteínas G constituem um grupo heterogêneo de compostos, alguns dos quais são sensíveis à inativação pela toxina de *Bordetella pertussis*, particularmente as dos tipos G_i e G_o (Kaziro *et al.*, 1991; Strosberg, 1991). O presente estudo demonstra que o tratamento de cobaias com a toxina pertussis atenua a depressão das respostas neurogênicas do íleo causado pela morfina sem, contudo, modificar o perfil de ação causado pela endotelina-1 nesta preparação. Esses resultados sugerem que os receptores responsáveis pelas ações da endotelina-1 (e talvez de outras endotelinas) no íleo não são acoplados a proteínas G_i ou G_o sensíveis à toxina de *Bordetella pertussis*.

Embora o presente estudo não tenha evidenciado a participação de proteínas G_i ou G_o na mediação dos efeitos da endotelina-1 no íleo, Bitar *et al.* (1992) observaram que anticorpos para 3 subtipos de proteína G_i inibem a contração da musculatura lisa reto-sigmoidea de coelho. Assim, parece haver diferenças pronunciadas quanto aos subtipos de proteínas G mediando os efeitos contráteis da endotelina-1 na musculatura lisa de porções

distintas do trato gastrintestinal. Também há evidências de que, em outros tecidos, as proteínas G envolvidas na mediação dos efeitos das endotelinas podem ser sensíveis ou não à toxina de *Bordetella pertussis*. Essa toxina não altera a formação de inositol trifosfato bem como o aumento da concentração citosólica de cálcio induzidos pela endotelina-1 em células musculares lisas vasculares (Mitsubishi *et al.*, 1989; Muldoon *et al.*, 1989), ou a ativação de fosfolipase C causada pelo peptídeo em miócitos cardíacos (Vigne *et al.*, 1990; Hilal-Dandan *et al.*, 1992). Por outro lado, a toxina bloqueia parcialmente os efeitos mitogênicos da endotelina-1 em fibroblastos (Bobik *et al.*, 1990) e a ativação da fosfolipase C em astrócitos (Lin *et al.*, 1990a), enquanto o efeito inotrópico do peptídeo e sua capacidade em inibir a adenilato ciclase em miócitos ventriculares são bloqueados por completo (Kelly *et al.*, 1990; Hilal-Dandan *et al.*, 1992). Também Nambi *et al.* (1990) verificaram que a atividade da topoisomerase I ativada pela endotelina-1 é abolida pela toxina. Curiosamente, há um relato de que a toxina de *Bordetella pertussis* aumenta a liberação de aspartato induzida por endotelina-1 em células granulares de cerebelo (Lin *et al.*, 1990b). Tais discrepâncias apontam para uma grande diversidade nas proteínas G capazes de acoplar os receptores das endotelinas a diferentes efeitos. É bastante provável, como sugeriu Huggins *et al.* (1993), que os tipos de proteínas responsáveis pelo acoplamento dependam de múltiplos fatores, incluindo o tecido, o efeito e a espécie em questão. Ainda, como um mesmo receptor pode estar acoplado a vários mecanismos de efetuação numa mesma célula, diferentes proteínas G podem ser responsáveis pela mediação de efeitos distintos e paralelos de um agonista (Hoyer & Boddeke, 1993).

Conforme foi mencionado na introdução, as endotelinas são encontradas ao longo do trato gastrintestinal. Com relação ao intestino delgado, em particular, a presença de

endotelina-1 e/ou a expressão de RNA-mensageiro ao peptídeo já foi demonstrada no duodeno de porco (Kitamura *et al.*, 1990; Hemsén, 1991), fêo de camundongo (Saida *et al.*, 1989) e cobaia (MacCumber *et al.*, 1989), e ao longo de todo o intestino delgado de rato, que também contém endotelina-3 (Matsumoto *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990). Merece destaque, ainda, a ocorrência de VIC, uma variante da endotelina-2, no fêo de camundongo (Saida *et al.*, 1989). A maior parte da endotelina-1 presente no intestino delgado de rato parece estar localizada na mucosa (Takahashi *et al.*, 1990). No entanto, dada a presença de endotelina-1 e endotelina-3 em plexos nervosos próximos à musculatura lisa do estômago de rato (Saeki *et al.*, 1993) e em plexos mioentéricos e submucosos do cólon humano (Inagaki *et al.*, 1991), é possível que tais peptídeos também ocorram em neurônios do intestino delgado.

Quais seriam as possíveis funções fisiológicas e/ou fisiopatológicas desses peptídeos no intestino? A endotelina-1 promove secreção de íons cloreto pela mucosa do fêo de coelho (Brown & Smith, 1991) e do cólon de rato (Moumami *et al.*, 1992a; Kiyohara *et al.*, 1993) e coelho (Brown & Smith, 1991; Roden *et al.*, 1992), e inibe a reabsorção de cloreto de sódio no cólon de rato (Kiyohara *et al.*, 1993). Tais evidências sugerem que as endotelinas possam regular processos de secreção iônica no intestino. Permanecem a ser caracterizadas as células responsáveis e os mecanismos envolvidos na produção e ação das endotelinas na mucosa intestinal. Por outro lado, as endotelinas liberadas pela mucosa intestinal ou pelos neurônios mioentéricos poderiam atuar, de forma parácrina, sobre outros neurônios ou sobre a musculatura lisa, provocando, direta ou indiretamente, alterações de motilidade intestinal. Considerando que pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa apresentam maior quantidade de endotelina-1 imunoreativa no intestino (Murch *et al.*,

1992), as endotelinas podem ser relevantes na manifestação da diarreia e hipermotilidade intestinal associadas às duas condições.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho procurou caracterizar os efeitos das endotelinas no íleo de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo. Os resultados obtidos indicam que as endotelinas causam um efeito bifásico concentração-dependente na preparação, que consiste na depressão transitória das respostas neurogênicas e no surgimento de uma contração sustentada.

O efeito depressor possivelmente decorre da ativação de receptores ET_B , pois a sarafotoxina S6c, a endotelina-1 e a endotelina-3 são equipotentes entre si e mais potentes que a endotelina-2 na produção desse efeito, que não é antagonizado pelo antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123. Ainda, ocorreu dessensibilização cruzada entre os efeitos da sarafotoxina S6c e da endotelina-1. O efeito independe da síntese de eicosanóides ou da ativação de canais de cálcio do tipo "L" ou de canais de potássio ATP-dependentes, pois não foi bloqueado pela indometacina, nicardipina ou glibenclamida, e parece ser mediado em parte por uma ação pós-juncional.

O efeito contrátil das endotelinas possivelmente envolve a estimulação de receptores ET_A e ET_B , pois a endotelina-3 é apenas 3 vezes menos potente que a endotelina-1 ou a endotelina-2, e o BQ-123 inibe mais seletivamente a contração produzida pela endotelina-1 do que pela sarafotoxina S6c. Além disso, não houve dessensibilização cruzada entre os efeitos contráteis da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c. A contração é inibida parcialmente pela indometacina, enquanto que a nicardipina e a cromacalina (um ativador de canais de potássio ATP-dependentes) praticamente abolem a resposta. Embora outros estudos sugiram que a contração do íleo induzida pelas endotelinas possa envolver ativação de motoneurônios colinérgicos, a tetrodotoxina e a atropina não modificaram essa ação da endotelina-1. Esse

componente parece, portanto, ser mediado por uma ação pós-juncional que independe da sensibilização da musculatura lisa a outros agonistas contráteis.

Os componentes do efeito bifásico das endotelinas no fêto de cobaia parecem envolver a ativação de receptores distintos que não são acoplados através de proteínas G sensíveis à toxina de *Bordetella pertussis*, já que os efeitos da endotelina-1 não foram influenciados pelo tratamento da cobaia com a toxina.

Parte dos resultados do presente estudo já foram publicados (Guimarães e Rae, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261: 1253-1259, 1992).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. The present study was undertaken to assess the effects of endothelins on the guinea pig field-stimulated ileum. An attempt was also made to characterize the receptors and cellular mechanisms involved in these effects.

2. Endothelin-1, endothelin-2, endothelin-3 and sarafotoxin S6c (0.3 to 30 nM) all caused dual effects, comprised of a transient inhibition of neurogenic twitch responses, allied to a tonic contraction. The rank order of potencies (IC_{50} s in nM) for the twitch-depressor effect was: sarafotoxin S6c (0.6) = endothelin-3 (1.2) = endothelin-1 (1.5) > endothelin-2 (10.5). The maximal depressor effects of the first two agonists were greater than those produced by the later. The rank order of potencies (EC_{50} s in nM) for the contractile effects was: endothelin-1 (2.3) = endothelin-2 (2.5) > endothelin-3 (8.2) > sarafotoxin S6c (> 10). Endothelin-1 caused a greater maximal contraction than the other agonists.

3. The selective ET_A receptor antagonist BQ-123 (30 and 100 nM) failed to modify the twitch-depression induced by endothelin-1 (1, 3 and 10 nM) or sarafotoxin S6c (1, 3 and 10 nM), but inhibited contractions induced by all concentrations of endothelin-1. However, BQ-123 only attenuated the contractile responses to a high concentration of sarafotoxin S6c (30 nM).

4. Prior exposure to endothelin-1 (3 nM) or sarafotoxin S6c (10 nM), 30 min before a second exposure to an agonist, induced cross-desensitization to the twitch-depressor effects of either peptide. In contrast, prior exposure to endothelin-1 induced desensitization to its own contractile effect, but not to that of sarafotoxin S6c. Also, sarafotoxin S6c (10 nM) did not induce tachyphylaxis to its own contractile effect or that of endothelin-1.

5. The depression of neurogenic contractions by endothelin-1 (3 nM) was not influenced by indomethacin (5.6 μ M), cromakalim (10 μ M), glibenclamide (3 μ M) or nicardipine (100 nM). In contrast, the contractile effect was attenuated by indomethacin, cromakalim and nicardipine, but not by atropine (300 nM), tetrodotoxin (300 nM) or glibenclamide.

6. Endothelin-1 (up to 30 nM) did not affect contractions triggered by acetylcholine (30 nM), histamine (100 nM), bradykinin (10 nM) or substance P (1 nM). However, endothelin-3 (up to 30 nM) relaxed transiently ileal segments precontracted with acetylcholine (300 nM) or histamine (1 μ M).

7. Pretreatment of guinea pigs with pertussis toxin (50 μ g/kg, i.p., 6 days before sacrifice) significantly reduced the twitch depression caused by morphine (1 nM to 3 μ M), but did not modify the dual effects of endothelin-1 (1 to 30 nM).

8. It is concluded that endothelins inhibit neurogenic responses of the guinea pig ileum by activating ET_B receptors. This effect is not a consequence of opening of ATP-dependent potassium channels, L-type calcium channels or eicosanoid synthesis, appears to be mediated in part by a direct action on smooth muscle cells and does not depend on coupling by a pertussis toxin-sensitive G protein.

9. On the other hand, the contractile effect is possibly mediated by both ET_A and ET_B receptors, coupled via pertussis toxin-insensitive G protein to activation of L-type calcium channels and, to a lesser degree, eicosanoid synthesis. This effect of the endothelins is not the result of a modulatory action on responses to other contractile agonists. Moreover, in contrast to results obtained by others, the current study found no evidence for partial mediation of the contraction by an action of endothelins on cholinergic

motoneurons.

10. The current study strengthens the view that endothelins may play important physiological roles as regulators of intestinal motility.

Part of the results presented in the current study have been published (Guimarães and Rae, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261: 1253-1259, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBAR, I. & SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur. J. Pharmacol.*, **245**: 31-45, 1993.
- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H. & NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature (London)*, **348**: 730-732, 1990.
- ARAMORI, I.; NIREI, H. & SHOUBO, M. Subtype selectively of a novel endothelin antagonist, FR139317, for the two endothelin receptors in transfected chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.*, **43**: 127-131, 1993.
- AUGUET, M.; DELAFLOTTE, S.; CHABRIER, P.-E.; PIROTZKY, E.; CLOSTRE, F. & BRAQUET, P. Endothelin and Ca⁺⁺ agonist Bay K 8644: diferent vasoconstrictive properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**: 186-192, 1988.
- BAKRIS, G.L.; FAIRBANKS, R.; TRAISH, M.; AKERSTROM, V. & KERN. Arginine vasopressin stimulates human mesengial cell production of endothelin. *J. Clin. Invest.* **87**: 1158-1164, 1991.
- BATTISTINI, B.; FILEP, J.G.; CRAGOE JR., E.J.; FOURNIER, A. & SIROIS, P. A role for Na⁺/H⁺ exchange in contraction of guinea pig airways by endothelin-1 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 583-588, 1991.
- BATTISTINI, B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. & SIROIS, P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.*, **68**: 600-628, 1993.
- BAZIL, M.K.; LAPPE, R.W. & WEBB, R.L. Haemodynamic effects of an endothelin receptor antagonist in three rat models of hypertension. *J. Hypertens.*, **10** (Suppl. 4): S49-S54, 1992.

- BODOLAH, A.; WOLBERG, G.; FLEMINGER, G. & KOCHVA, E. SRTX-d, a new native peptide of the endothelin/sarafotoxin family. *FEBS Lett.*, **256**: 1-3, 1989.
- BITAR, K.N.; STEIN, S. & OMANN, G.M. Specific proteins mediate endothelin induced contraction. *Life Sci.*, **50**: 2119-2124, 1992.
- BLANCK, M.A.; FUORTES, M. & NYREN, O. Effect of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor on blood flow and output of vasoactive intestinal polypeptide in the feline colon. *Life Sci.*, **48**: 1937-1944, 1991.
- BLOCH, K.D.; EDDY, R.L. & SHOWS, T.B. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J. Biol. Chem.*, **26**: 18156-18161, 1989.
- BOARDER, M. & MARRIOTT, D.B. Endothelin-1 stimulation of noradrenaline and adrenaline release from adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* **41**: 521-525, 1991.
- BOBIK, A.; GROONS, A.; MILLAR, J.A.; MITCHELL, A. & GRINPUNKEL, S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **258**: C408-C415, 1990.
- BOLGER, G.T.; LIARD, F. & JARAMILLO, J. Tissue selectivity and calcium dependent of contractile responses to endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **155**: 946-958, 1990.
- BOLGER, G.T.; LIARD, F.; GARNEAU, M. & JARAMILLO, J. Characterization of intestinal smooth muscle responses and binding sites for endothelin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**: 377-384, 1992.
- BORGES, R.; VON GRAFENSTEIN, H. & KNIGHT, D.E. Tissue selectivity of endothelin. *Eur. J. Pharmacol.* **165**: 223-230, 1989.

- BOUSSO-MITTLER, D.; KLOOG, Y.; WOLBERG, Z.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E. & SOKOLOVSKY, M. Functional endothelin/sarafotoxin receptors in the rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**: 952-957, 1989.
- BRAQUET, P.; TOUVAY, C.; LAGENTE, V.; VILAIN, B.; PONS, F.; HOSFORD, D.; CHABRIER, P.-E. & MENCIA-HUERTA, J.M. Effect of endothelin-1 on blood pressure and broncopulmonary system of the guinea pig. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13** (Suppl. 5): S143-S146, 1989.
- BROWN, M.A. & SMITH, P.L. Endothelin: a potent stimulator of intestinal ion secretion in vitro. *Regul. Pept.*, **36**: 1-19, 1991.
- BUCHER, B.; PAYA, D. & STOCLET, J.-C. Modulation of [³H]noradrenaline release by endothelin-1 in the rat tail artery. *Neurochem. Int.*, **18**: 455-459, 1991.
- CALIXTO, J.B. & RAE, G.A. Effects of endothelins, Bay K 8644 and other oxytocics in non-pregnant and late pregnant rat isolated uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, **192**: 109-116, 1991.
- CASEY, M.L.; WORD, R.A. & MACDONALD, P.C. Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in avascular human amnion. *J. Biol. Chem.*, **266**: 5762- 5768, 1991.
- CLOZEL, M.; BREU, V.; BURRI, K.; CASSAL, J.-M.; FISCHLI, W.; HIRTH, G.; LÖFFER, B.-M.; MÜLLER, M.; NEIDHART, W. & RAMUZ, H. The discovery of Ro 46-2005, an orally available non-peptide antagonist of ET_A and ET_B receptors. **Third International Conference on Endothelin**. Houston, Feb., 17P, 1993.

- COCKS, T.M.; MALTA, E.; KING, S.J.; WOODS, R.L. & ANGUS, J.A. Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. *Eur. J. Pharmacol.*, **196**: 177-182, 1991.
- CODY, W.L., DOHERTY, A.M.; HE, J.X.; DEPUE, P.L.; RAPUNDALO, HINGORANI, G.A.; MAJOR, T.C.; PANEK, R.L.; DUDLEY, D. T.; HALEEN, S.J.; LADOUCEUR, D.; HILL, K.E.; FLYNN, M.A. & REYNOLDS, E.E. Design of a functional hexapeptide antagonist of endothelin. *J. Med. Chem.* **35**: 3301-3303, 1992.
- CYR, C.; HUEBNER, K.; DRUCK, T. & KRIS, R. Cloning and localisation of a human endothelin ETA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**: 184-190, 1991.
- DAVENPORT, A.P. & MAGUIRE, J.J. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET_A receptors in humans? *Tr. Pharmacol. Sci.*, **15**: 9-11, 1993.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALTER, C.; WARDER, T.D. & VANE, J.R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9797-9800, 1988.
- D'ORLEANS-JUSTE, P.; FINET, M.; DE NUCCI, G. & VANE, J. Pharmacology of endothelin-1 in isolated vessels: effect of nicardipine, methylene blue, hemoglobin, and gossypol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13** (Suppl. 5): S19-S22, 1989.
- EGLIN, T.M. & WHITING, R.L. The action of prostanoid receptor agonists and antagonists on smooth muscle and platelets. *Br. J. Pharmacol.*, **94**: 591-597, 1988.
- EGLIN, T.M.; MICHEL, A.D. & SHARIF, N.A. The pharmacological properties of the peptide endothelin. *Br. J. Pharmacol.*, **97**: 1297-1307, 1989.

- EGLEZOS, A., CUCCHI, P.; PATAACCHINI, R.; QUARTARA, L.; MAGGI, C.A. & MIZRAHI, J. Differential effects of BQ-123 against endothelin-1 and endothelin-3 on the rat vas deferens: evidence for an atypical endothelin receptor. *Br. J. Pharmacol.* **109**: 736-738, 1993.
- ESMON, C.T. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*, **235**: 1348-1352, 1987.
- FERRARIO, R.G.; FOULKES, R.; SALVATI, P. & PATRONO, C. Hemodynamic and tubular effects of endothelin and tromboxane in the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* **171**: 127-134, 1989.
- FILEP, J.G.; BATTISTINI, B.; CÔTÉ, Y.P.; BEAUDOIN, A.R. & SIROIS, P. Endothelin-1 induces prostacyclin release from bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**: 171-176, 1991.
- FILLIPINI, A.; FRIPICIANO, A. & PALOMBI, F. Induction by endothelin-1 of epithelium dependent relaxation of guinea-pig trachea in vitro: role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 637-644, 1993.
- FLEMING, W.W.; WESTFALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S. & JELLETT, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **181**: 339-345, 1972.
- FUJIMOTO, M.; MIHARA, S.-I.; NAKAJIMA, S.; UEDA, M.; NAKAMURA, M. & SAKURAI, K.-S. A novel non-peptide endothelin antagonist isolated from bayberry, *Myrica cerifera*. *FEBS Let.*, **305**: 41-44, 1992.

- FUKUDA, N.; IZUMI, Y.; SOMA, M.; YOSHIYASU, W.; WATANABE, M.; HATANO, M.; SAKUMA, I. & YASUDA, H. L-N^G-monomethyl arginine inhibits the vasodilating effects of low dose of endothelin-3 on the rat mesenteric arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**: 739-745, 1990.
- FUKUDA, N.; SOMA, M.; IZUMI, Y.; MINATO, M.; WATANABE, Y.; WATANABE, M. & HATANO, M. Low doses of endothelin-3 elicit endothelium dependent vasodilation which accompanies with elevation of cyclic GMP. *Japanese Circ. J.*, **55**: 617-621, 1991.
- FUKUNAGA, Y.; MINE, Y.; YOSHIKAWA, S.; TAKAEUCHI, T.; HATA, F. & YAGASAKI, O. Role of prostacyclin in acetylcholine release from myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **233**: 237-242, 1993.
- FUKURODA, T.; NOGUCHI, K.; TSUCHIDA, S.; NISHIKIBE, M.; IKEMOTO, F.; KADA, K. & YANO, M. Inhibition of biological actions of big endothelin-1 by phosphoramidon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**: 390-399, 1990.
- FULGINITI, J.; COHEN, M.M. & MORELAND, R.S. Endothelin differentially affects rat gastric longitudinal and circular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **265**: 1413-1420, 1993.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376, 1980.
- GAION, R.M. & TRENTO, M. The role of prostacyclin in modulating cholinergic neurotransmission in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **80**: 279-284, 1983.
- GANDHI, C.R.; BEHAL, R.H. & HARVEY, S.A. Hepatic effects of endothelin. Receptor characterization and endothelin-induced signal transduction in hepatocytes. *Biochem. J.*, **287**: 897-904, 1992.

- GARCIA-PASCUAL, A.; LARSSON, B. & ANDERSSON, K.E. Contractile effects of endothelin-1 and localization of endothelin binding sites in rabbit lower urinary tract smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **140**: 545-555, 1990.
- GARCIA-PASCUAL, A.; PERSSON, K.; HOLMQUIST, F. & ANDERSSON, K-E. Endothelin-1-induced phosphoinositide hydrolysis and contraction in isolated rabbit detrusor and urethral smooth muscle. *Gen. Pharmac.*, **24**: 131-138, 1993.
- GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; KEMP, P.A. & BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of N^G-nitro-arginine methyl ester. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 632-639, 1990.
- GILLESPIE, M.N.; OWASOYO, J.O.; MCMURTRY, I.F. & O'BRIEN, R.F. Sustained coronary vasoconstrictor provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in cultured. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 339-343, 1986.
- GOETZ , K.L.; WANG, B.C.; MADWED, J.B.; ZHU, J.L. & LEADLEY, R.J. Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, **255**: R1064-R1068, 1988.
- GOTO, K.; KASUYA, Y.; MATSUKI, N.; TAKUWA, Y.; KURIHARA, H.; ISHIKAWA, T.; KIMURA, S.; YANAGISAWA, M. & MASAKI, T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 3915-3918, 1989.
- GRAY, G.A.; CLOZEL, M.; BREU, V. & LÖFFER, B.-M. In vitro pharmacological properties of Ro 46-2005, a non-peptide antagonist of ET_A and ET_B receptors. **Third International Conference on Endothelin**. Houston, Feb. 15-17, 37P, 1993.

- GRIENDLING, K.K.; TSUDA, T. & ALEXANDER, R.W. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8237-8240, 1989.
- GU, X.H.; CASLEY, D. & NAYLER, W. Specific high-affinity binding sites for ¹²⁵I-labelled porcine endothelin in rat cardiac membranes. *Eur. J. Pharmacol.*, **167**: 281-290, 1989a.
- GU, X.; LIU, J.J.; DILLON, J.S. & NAYLER, W.G. The failure of endothelin to displace bound, radioactively-labelled, calcium antagonists (PN 200/110, D888 and diltiazem). *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 262-264, 1989b.
- GUIMARÃES, C.L.; CALIXTO, J.B. & RAE, G.A. Potent constrictor actions of endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3 in rat isolated portal vein. *Hypertension* **19** (suppl. II): II-79-II-86, 1992.
- HASUNUMA, K.; RODMAN, D.M.; O'BRIEN, R.F. & McMURTRY, I.F. Endothelin-1 causes pulmonary vasodilation in rats. *Am. J. Physiol.*, **259**: H48-H54, 1990.
- HAY, D.W.P.; HENRY, P.J. & GOLDIE, R.G. Endothelin and the respiratory system. *TIPS*, **14**: 29-32, 1993.
- HAYNES, W.G. & WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin. Sci.*, **84**: 485-500, 1993.
- HEMSEN, A. Biochemical and functional characterization of endothelin peptides with special reference to vascular effects. *Acta Physiol. Scand.* **142**: (Suppl. 602), 1-61, 1991.
- HENRY, P.J.; RIGBY, P.J.; SELF, G.J.; PREUSS, J.M. & GOLDIE, R.G. Endothelin-1-induced [³H]-inositol phosphate accumulation in rat trachea. *Br. J. Pharm.*, **105**: 135-141, 1992.

- HENRY, P.J. Endothelin-1-induced contraction in rat isolated trachea - involvement of ET(A) and ET(B) receptors and multiple signal transduction systems. *Br. J. Pharmacol.*, **100**: 435-441, 1993.
- HICKEY, K.A; RUBANNYI, G.; PAUL, R.J. & HIGHSMITH, R.F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **248**: C550-C556, 1985.
- HILAL-DANDAN, R.; URASAWA, K. & BRUNTON, L.L. Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 10620-10624, 1992.
- HILEY, C.R.; PELTON, J.T. & MILLER, R.C. Effects of endothelin on field stimulated rat vas deferens and guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **96**: 104P, 1989.
- HIRAI, M.; MIYABO, S.; OOYA, E.; MIYANAGA, K.; AOYAGI, N.; KIMURA, K.; KISHIDA, S. & NAKAI, T. Endothelin-3 stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Life Sciences*, **48**: 2359- 2363, 1991.
- HOLMQUIST, F.; ANDERSSON, K-A. & HEDLUND, H. Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol. Scand.*, **139**: 113-122, 1990.
- HOSADA, K.; NAKAO, K. & HIROSHIARAI ET AL. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.*, **287**: 23-26, 1991.
- HOYER, D. & BODDEKE, H.W.G.M. Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **14**: 341-345, 1993.
- HU, J.R.; BERNINGER, U.G. & LANG, R.E. Endothelin stimulates atrial natriuretic peptide (ANP) release from rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 177-178, 1988a.

- HU, J.R.; HARSDORF, R.V. & LANG, R.E. Endothelin has potent inotropic effects in rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 275-278, 1988b.
- HU, S.; KIM, H.S. & JENG, A.Y. Dual action of endothelin-1 on the Ca^{2+} -activated K^+ channel in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Eur. J. Pharm.*, **194**: 31-36, 1991.
- HUGGINS, J.P.; PELTON, J.T. & MILLER, R. The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmac. Ther.*, **59**: 55-123, 1993.
- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.*, **26**: 223-242, 1992.
- IHARA, M.; FUKURODA, T.; SAEKI, T.; NISHIKIBE, M.; KOJIRI, K.; SUDA, H. & YANO, M. An endothelin receptor (ET_A) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 132-137, 1991.
- IHARA, M.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; KIMURA, S.; OZAKI, S.; PATEL, A.C. & YANO, M. A novel radioligand [^{125}I]BQ-3020 selective for endothelin (ET_B) receptors. *Pharmacol. Lett.*, **51**: P48-P52, 1992a.
- 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 endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.*, **50**: 247-255, 1992b.
- INAGAKI, H.; BISHOP, A.E. & YURA, J. Localization of endothelin-1 and its binding sites to the nervous system of the human colon. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17** (Suppl. 7): S455-S457, 1991a.

- INAGAKI, H.; BISHOP, A.E.; ESCRIG, C.; WHARTON, J.; ALLEN-MERSH, T.G. & POLAK, J.M. Localization of endothelin-like immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterology*, **101**: 47-54, 1991b.
- INOUE, A; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MITSUI, Y.; KOBAYASHI, M. & MASAKI, T. The human preproendothelin-1 gene. *J. Biol. Chem.*, **264**: 14954-14959, 1989.
- ISHIDA, N.; TSUJIOKA, K.; TOMOI, M.; SAIDA, K. & MITSUI, Y. Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery. *FEBS Lett.*, **247**: 337-340, 1989.
- JAFFE, E.M. Physiologic Functions of Normal Endothelial Cells. In.: Atherosclerosis. Reprinted from vol. 454, pp. 123-146, 1987. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- JENG, A.Y.; SAVAGE, P. & SORIANO, A. Different affinities and selectivities of endothelin-1 and endothelin-3 binding to various rat tissues. *Biochem. Int.*, **22**: 669-676, 1990.
- JONES, C.R.; HILEY, C.R.; PELTON, J.T. & MOHR. Autoradiographic visualization of the binding sites for [¹²⁵I]endothelin in rat and human brain. *Neurosci. Lett.*, **97**: 276-279, 1989.
- KAMIMURA, Y.; SAWADA, N. & AOKI, M. Endothelin-1 induces contraction of bile canaliculi in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 817-822, 1993.
- KANSE, S.M.; TAKAHASHI, K.; LAM, H.-C.; RESS, A.; WARREN, J.B.; PORTA, M.; MOLINATTI, P.; GHATEI, M. & BLOOM, S.R. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci.*, **48**: 1379-1384, 1991.

- KARAKI, H.; SUDJARWO, S.A.; HORI, M.; URADE, Y.; TAKAI, M. & OKADA, T. Endothelin B receptor antagonist, IRL 1038, augments the endothelin-induced contraction in rat aorta. In: *Third International Conference on Endothelin*. Houston, Feb. 15-17, 53p., 1993.
- KASUYA, Y.; TAKUWA, Y.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; GOTO, K. & MASAKI, T. Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**: 1049-1055, 1989.
- KAZIRO, Y.; ITOH, H.; KOZASA, T.; NAKAFUKU, M. & SATOH, T. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**: 349-400, 1991.
- KELLY, R.A.; EID, H.; KRAMER, B.K.; O'NEILL, M.; LIANG, B.T.; REERS, M. & SMITH, T.W. Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by toxin-sensitive pathway. *J. Clin. Invest.*, **86**: 1164-1171, 1990.
- KENAKIN, T. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*, 2nd Edition, Raven Press, New York, pp 344-384, 1993.
- KIM, S.; MORIMOTO, S.; KOH, E.; MIYASHITA, Y. & OGIHARA, T. Comparison of effects of a potassium channel opener BRL 34915, a specific potassium ionophore valinomycin and calcium channel blockers on endothelin-induced vascular contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 1003-1008, 1989.
- KING, A.J.; BRENNER, B.M. & ANDERSON, S. Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am. J. Physiol.*, **256**: F1051-1058, 1989.

- KITAJIMA, T.; YAMAGUCHI, T. & TANI, K. Role of endothelin and platelet-activating factor in indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. *Digestion*, **54**: 156-159, 1993.
- KITAMURA, K.; YUKAWA, T.; MORITA, S.; ICHIKI, Y.; ETO, T. & TANAKA, K. Distribution and molecular form of immunoreactive big endothelin-1 in porcine tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**: 497-503, 1990.
- KITAYOSHI, T.; WATANABE, T. & SHIMAMOTO, N. Cardiovascular effects of endothelin in dogs: positive inotropic action in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **166**: 519-522, 1989.
- KIYOHARA, T.; OKUNO, M.; NAKANISHI, T.; SHINOMURA, Y. & MATSUZAWA, W. Effect of endothelin-1 on ion transport in isolated rat colon. *Gastroenterology*, **104**: 1328-1336, 1993.
- KLOOG, Y.; AMBAR, I.; SOKOLOVSKY, M. & WOLLBERG, Z. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, **242**: 268-270, 1988.
- KOSEKI, C.; IMAI, M.; HIRATA, Y.; YANAGISAWA, M. & MASAKI, T. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide? *Am. J. Physiol.*, **256**: R858-R866, 1989.
- KURIHARA, H.; YOSHIKUMI, M., SUGIYAMA, T., TAKAKU, F.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; HAMAOKI, M.; KATO, H. & YAZAKI, Y. Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 1435-1440, 1989.
- LAZZARATOS, S.; KASHIMURA, H. & NAKAHARA, A. Gastric ulcer induced by submucosal injection of endothelin-1- Role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am. J. Physiol.*, **265**: G491-G498, 1993.

- 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **340**: 744-751, 1989.
- LIN, W.-W. & LEE, C.Y. Biphasic effects of endothelin in the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **176**: 57-62, 1990.
- LIN, W.-W.; LEE, C.Y. & CHUANG, D.-M. Endothelin-1 stimulates the release of preloaded [³H] D-aspartate from cultured cerebellar granule cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**: 593-599, 1990a.
- LIN, W.-W.; LEE, C.Y. & CHUANG, D.-M. Comparative studies of phosphoinositide hydrolysis induced by endothelin-related peptides in cultured cerebellar astrocytes, C6-glioma and cerebellar granule cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**: 512-519, 1990b.
- LIN, W.- W. & LEE, C.Y. Intestinal relaxation by endothelin isopeptides: involvement of Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.*, **219**: 355-360, 1992.
- LOFFLER, B.M. & LOHRER, W. Different endothelin receptor affinities in dog tissues. *J. Receptor Res.*, **11**: 293-298, 1991.
- LUEDECKENS, G.; BIGL, H. & SPERLING, J. Importance of secondary TXA₂ release in mediating of endothelin-1 induced bronchoconstriction and vasopressin in the guinea-pig. *Prost. Leuk. Essent. Fat. Acids*, **48**: 261-263, 1993.
- LUJÁN, M.; LÓPEZ, E.; RAMÍREZ, R.; AGUILAR, H.; MARTINEZ-OLMEDO, M.A. & GARCIA-SAINZ, J.A. Pertussis toxin blocks the action of morphine, norepinephrine and clonidine on isolated guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **100**: 377-380, 1984.

- MACCUMBER, M.M.; ROSS, C.A.; GLASER, B.M. & SNYDER, SH. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 7285-7289, 1989.
- MACNAUGHTON, W.; KEENAN, C.M. & MCKNIGHT, W.G. The modulation of gastric mucosal integrity by endothelin-1 and prostacyclin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13** (Suppl. 5): S118-S122, 1989.
- MACNULTY, E.E.; PLEVIN, R. & WAKELAM, M.J.D. Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for rat-1 fibroblasts. *Biochem. J.*, **272**: 761-767, 1990.
- MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. & MELI, A. The C-terminal hexapeptide, endothelin (16-21) discriminates between different endothelin receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **166**: 121-122, 1989a.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; GIULIANI, S. & MELI, A. Potent contractile effect of endothelin in isolated guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, **160**: 179-182, 1989b.
- MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, P.S.; TURINI, D.; BARBANTI, G. & MELI, A. Potent contractile activity of endothelin on the human isolated urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 755-757, 1989c.
- MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. & MELI, A. The activity of peptides of the endothelin family in various mammalian smooth muscle preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, **174**: 23-31, 1989d.
- MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, R.; BARBANTI, G.; TURINI, D. & MELI, A. Contractile responses of the human urinary bladder, renal pelvis and renal artery to endothelins and sarafotoxin S6b. *Gen. Pharmacol.*, **21**: 247-249, 1990.

MCMAHON, E.G.; PALOMO, M.A.; MOORE, W.M.; MCDONALD, J.F. & STERN, M.K.

Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 703-707, 1991.

MARTIN, E.R.; BRENNER, B.M. & BALLERMANN, B.J. Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. *J. Biol. Chem.*, **265**: 14044-14049, 1990.

MARÍN, J. & SÁNCHEZ-FERRER, C.F. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *Gen. Pharmacol.*, **5**: 575-587, 1990.

MASUDA, E.; HAYASHI, N.; FUSAMOTO, H. & KAMADA, T. Effect of intravascular ethanol on modulation of gastric mucosal integrity: possible role of endothelin-1. *Am. J. Physiol.*, **262**: G785-G790, 1982.

MASUDA, E.; KAWANO, S. & NAGANO, K. Role of endogenous endothelin in pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Am. J. Physiol.*, **265**: G474-G481, 1993.

MATSUMURA, Y.; HISAKI, K.; TAKAOKA, M. & MORIMOTO, S. Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin-1. *Eur. J. Pharmacol.*, **185**: 103-106, 1990.

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

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

- MIASIRO, N. & PAIVA, A.C. Effects of endothelin-1 on the isolated guinea-pig ileum: Role for sodium ions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **342**: 706-712, 1990.
- MIASIRO, N. & PAIVA, A.C. Effects of endothelin-3 on the isolated guinea-pig ileum: role of Na⁺ ions and endothelin receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, **214**: 133-141, 1992.
- MIASIRO, N.; NAKAIE, C.R. & PAIVA, A.C.M. Endothelin (16-21): biphasic effect and no desensitization on the guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 68-72, 1993.
- MILLER, W.L.; REDFIELD, M.M. & BURNETT, J.C. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J. Clin. Invest.*, **83**: 317-320, 1989.
- MILLER, R.C.; TOPOUZIS, S., PELTON, J.T. & HILEY, C.R. Effects of endothelin and of some endothelin analogues on some isolated smooth muscle preparations. In: *Endothelium-Derived Contracting Factors*, ed. by G.M. Rubanyi, C. Knolls and P.M. Vanhoutte, pp. 88-87, Karger, Basel, 1990.
- MITSUHASHI, T.; MORRIS, R.C., JR. & IVES, H.E. Endothelin-induced increases in vascular smooth muscle Ca⁺⁺ do not depend on dihydropyridine-sensitive Ca⁺⁺ channels. *J. Clin. Invest.*, **84**: 635-639, 1989.
- MIURA, K.; YUKIMURA, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMMEN, T.; OKUMURA, M.; IMANISHI, M. & YAMAMOTO, T. Endothelin stimulates the renal production of prostaglandin E₂ and I₂ in anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.* **170**: 91-93, 1989.
- MIYAMORI, I.; TAKEDA, Y.; YONEDA, T. IKI, K. & TAKEDA, R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from the rat mesenteric artery. *Life Sci.*, **49**: 1295-1300, 1991.
- MIYOSHI, Y.; NAKAYA, Y.; WAKATSUKI, T.; NAKAYA, S.; FUJINO, K.; SAITO, K. & INOUE, I. Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ. Res.*, **70**: 612-616, 1992.

- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S. & VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**: 663-665, 1976.
- MORISHIDA, R., HIGAKI, J. & OGIHARA, T. Endothelin stimulates aldosterone biosynthesis by dispersed rabbit adreno-capsular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**: 628-632, 1989.
- MOUMMI, C.; XIE, Y.; KACHUR, J.F. & GAGINELLA, T.S. Endothelin-1 stimulates contraction and ion transport in the rat colon: different mechanisms of actions. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **262**: 409-262, 1992a.
- MOUMMI, C.; GUILLIKSON, G.W. & GAGINELLA, T.S. Effect of endothelin-1 on guinea pig gallbladder smooth muscle in vitro. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **260**: 549-553, 1992b.
- MULDOON, L.L.; RODLAND, K.D.; FORSYTHE, M.L. & MAGUN, B.E. Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release, and gene expression in response to endothelin, a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8529-8536, 1989.
- MURCH, S.H.; BRAEGGER, C.P.; SESSA, W.C. & MACDONALD, T.T. High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet*, **339**: 381-385, 1992.
- NAKAJIMA, K.; KUMAGAE, S.; NISHIO, H.; KURODA, H.; WATANABE, T.; KOBAYASHI, Y.; TAMOKI, H.; KIMURA, T. & SAKAKIBARA, S. Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: Structure activity relationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**: S8-S12, 1989.

- NAKAMICHI, K.; IHARA, M.; KOBAYASHI, M.; SAEKI, T.; ISHIKAWA, K. & YANO, M. Different distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary tissues revealed by the novel selective ligands BQ 123 and [Ala^{1,3,11,15}]ET-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**: 144-150, 1992.
- NAKAMUTA, M.; TAKAYANAGI, R.; & SAKAI, Y. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**: 34-39, 1991.
- NAMBI, P.; PULLEN, M. & FEUERSTEIN, G. Identification of endothelin receptors in various regions of rat brain. *Neuropeptides*, **16**: 195-199, 1990.
- O'BRIEN, R.F. & MCMURTY, I.F. Endothelial cell (EC) supernatants contract bovine pulmonary artery (PA) rings. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **129**: A337, 1984.
- OGAWA, Y.; NAKAO, K.; & ARAI, H. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 248-255, 1991.
- OPGENORTH, T.J.; WU-WONG, J.R. & SHIOSAKI, K. Endothelin converting enzyme. *FASEB J.*, **6**: 2653-2659, 1992.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526, 1987.
- PAYNE, A.N. & WHITTLE, B.J.R. Potent cyclo-oxygenase-mediated bronchoconstrictor effect of endothelin in the guinea-pig in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 303-305, 1988.
- PERICO, N.; DADAN, J.; GABANELLI, M. & REMUZZI, G. Cyclooxygenase products and atrial natriuretic peptide modulate renal response to endothelin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**: 1213-1220, 1990.

- PESKAR, B.M.; NOWAK, P. & LAMBRECHT, N. Effect of prostaglandins and capsaicin on gastric vascular flow and mucosal injury in endothelin-1 treated rats. *Agents Actions*, **37**: 85-91, 1992.
- RADOMIROV, R.; PETKOV, V. & DAVIDOFF, M. Neurotransmitter effect of prostaglandin F_{2-alpha} in isolated cat jejunum. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **5**: 275-281, 1983.
- RAE, G.A.; TRYBULEC, G.; 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.
- RAE, G.A. & CALIXTO, J.B. Effects of endothelins on nerve-mediated contractions of mouse vas deferens. *Life Sci.*, **47**: PL83-PL89, 1990.
- RAE, G.A.; CALIXTO, J.B. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. Big-endothelin-1 contracts rat isolated uterus via a phosphoramidon-sensitive endothelin ET_A receptor-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, **240**: 113-119, 1993.
- RAPOPORT, R.M.; STAUDERMAN, K.A. & HIGHSMITH, R.F. Effects of EDCF and endothelin on phosphatidylinositol hydrolysis and contraction in rat aorta. *Am. J. Physiol.*, **258**: C122-C131, 1990.
- REID, J.J.; WONG-DUSTING, H.K. & RAND, M.J. The effect of endothelin on noradrenergic transmission in rat and guinea pig atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **168**: 93-96, 1989.
- REISER, G. & DONIÉ, F. Endothelin induces a rise of inositol 1,4,5-trisphosphate, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate levels and of cytosolic Ca²⁺ activity in neural cell lines. *Eur. J. Pharmacol.*, **2**: 9-775, 1990.

- REGOLI, D.; CADIEUX, A. & D'ORLÉNS-JUSTE, P. Vasoactive peptides and their receptors, in: *Methods in Neurosciences; Receptors, Model Systems and Specific Receptors*, ed. P.M. Conn (Academic Press, San Diego) Vol. 2, p. 43, 1993.
- 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.
- RODEN, M.; PLASS, H. & VIERHAPPER, H. Endothelin-1 stimulates chloride and potassium secretion in rabbit descending colon. *Eur. J. Pharmacol.*, **421**: 163-167, 1992.
- RUBANYI, G.M. & BOTELHO, L.H.P. Endothelins. *FEBS Let.*, **5**: 2713-2720, 1991.
- SAEKI, Y.; HIGUCHI, K. & NAKAMURA, S. Location of endothelin detected immunohistochemically in gastric mucosa. *Third International Conference on Endothelin*, Houston, Feb., 109P, 1993.
- SAIDA, K.; MITSUI, Y. & ISHIDA, P. A novel peptide vasoactive intestinal contractor of the endothelin peptide family. *J. Biol. Chem.*, **264**: 1413-1416, 1989.
- SAKAGUCHI, H.; KOZUKA, M.; HIROSE, S.; ITO, T. & HAGIWARA, H. Properties and localization of endothelin-1-specific receptors in rat testicles. *Am. J. Physiol.* **263**: E234-E241, 1992.

- SAKAMOTO, A.; YANAGISAWA, M. & SAKURAI, T. Cloning and functional expression in human cDNA for the big endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 656-663, 1991.
- SAKAMOTO, A.; YANAGISAWA, M.; SAWAMURA, T.; ENOKI, T.; OHTANI, T.; SAKURAI, T.; NAKAO, K.; TOYO-OKA, T. & MASAKI, T. Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin_A-selective antagonist and endothelin_B-selective agonists. *J. Biol. Chem.*, **268**: 8547-8553, 1993.
- SAKATA, K.; OZAKI, H. & KWON, S.-C. Effects of endothelin on the mechanical activity of cytosolic calcium level of various types of smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 483-492, 1989.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAUWA, 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**: 732-734, 1990.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; TAUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S. & GOTO, K. Molecular characterization of endothelin receptors. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **13**: 103-108, 1992.
- SAMSON, W.K.; SKALA, K.D., ALEXANDER, B.D. & HUANG, F.L.S. Pituitary site of action of endothelin: selective inhibition of prolactin release in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**: 737-743, 1990.
- SAWAMURA, T.; KASUYA, Y. & MATSUHITA, Y. Phosphoramidon inhibits the intracellular conversion of big endothelin-1 in cultured endothelial cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**: 779-784 1991.

SCHIEBINGER, R.J. & GOMEZ-SANCHEZ, C.E. Endothelin: a potent stimulus of atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria and its dependency on calcium. *Endocrinology*, **127**: 119-125, 1990.

SCHINI, V.B.; HENDRICKSON, H.; HEUBLEIN, D.M.; BURNETT, J.C. & VANHOUTTE, P.M. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **165**: 333, 1989.

SCHUMACHER, W.A.; STEINBACHER, T.E. & ALLEN, G.T. Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins*, **40**: 71-79, 1990.

SCHWÖERER, T. & KILBINGER, H. Effects of cromakalin on acetylcholine release and smooth muscle contraction in guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **339**: 706-708, 1989.

SHOJI, T. & GOTO, K. Comparison of the effects of endothelin-1 and Bay K 8644 on twitch contractions of the field-stimulated rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **193**: 371-374, 1990.

SILBERBERG, S.D.; PODER, T.C. & LACERDA, A.E. Endothelin increases single-channel currents in coronary arterial smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **247**: 68-73, 1989.

SIMONSON, M.S. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.*, **73**: 375-411, 1993.

SIMONSON, M.; 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.

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

- SOGABE, K.; NIREI, H. & SHOUBO, M. A novel endothelin receptor antagonist: studies with FR 139317. *J. Vasc. Res.*, **29**: 201-205, 1992.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarofotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signalling. *Pharm. Ther.*, **54**: 129-149, 1992.
- SPOKES, R.A.; MOHAMMAD, A.G. & BLOOM, S.R. Studies with endothelin-3 and endothelin-1 on rat blood pressure and isolated tissues: evidence for multiple endothelin receptors subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13 (Suppl. 5)**: S191-S192, 1989.
- STANDEN, N.B.; QUAYLE, J. M.; DAVIES, N.W.; BRAYDEN, J.E.; HUANG, Y. & NELSON, M.T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science*, **245**: 177-180, 1989.
- STAUMONT, G.; FIORAMONTI, J.; FREXINOS, J. & BUENO, L. Oral prostaglandin E analogues induce intestinal migrating motor complex after a meal in dogs. Evidence for a central mechanism. *Gastroenterology*, **98**: 888-891, 1990.
- STOJILKOVIC, S.S. & CATT, K.J. Neuroendocrine actions of endothelins. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **13**: 385-391, 1992.
- STROSBERG, A.D. Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur. J. Biochem.*, **196**: 1-10, 1991.
- SUGIURA, M.; INAGAMI, T. & KON, V. Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**: 1220-1227, 1989.
- SUZUKI, N.; MATSUMOTO, H.; KITADA, C.; KIMURA, S. & FUJINO, M. Production of endothelin-1 and big-endothelin-1 by tumor cells with epithelial-like morphology. *J. Biochem.* **106**: 736-741, 1989.

- SUZUKI, S.; SUZUKI, A.; KAJIKURI, J. & ITOH, T. Endothelin-1 induced prostaglandin E₂ production: modulation of contractile response of endothelin-1 in porcine coronary artery. *Eur. J. Pharmacol.*, 217: 97-100, 1992.
- TABUCHI, Y.; NAKAMARU, M.; RAKUGI, H.; NAGANO, M.; MIKAMI, H. & OGIHARA, T. Endothelin inhibits presynaptic adrenergic neurotransmission in rat mesenteric artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161: 803-808, 1989.
- TAKAHASHI, K.; JONES, P.M.; KANSE, S.M.; LAM, H.C.; SPOKES, R.A.; GHATEI, M.A. & BLOOM, S.R. Endothelin in the gastrointestinal tract. Presence of endothelin-like immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology*, 99: 1660-1667, 1990.
- TAKAYANAGI, R.; OHNAKA, K. & TAKAHASHI, C. Multiple subtypes of endothelin receptors in porcine tissues: characterization by ligand binding affinity labeling and regional distribution. *Reg. Peptides*, 32: 23-37, 1991.
- TANIYAMA, K.; KAN, S.; MIZUKO, Y. & NIWA, M. Involvement of cholinergic neurons in intestinal contraction caused by vasoactive intestinal contractor. *Eur. J. Pharmacol.*, 235: 149-151, 1993.
- TÉLÉMAQUE, S. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. Presence of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme which converts big-endothelin-1, but not big-endothelin-3, in the rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 344: 505-509, 1991.
- TSCHIRHART, E.J.; DRIJFHOUT, J.W.; PELTON, J.T.; MILLER, R.C. & JONES, C.R. Endothelins: functional and autoradiographic studies in guinea-pig trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258: 381-387, 1991.

- USUNE, S.; KATSURAGI, T. & FURKAWA, T. Involvement of K⁺ channel opening in endothelin-1 induced suppression of spontaneous contractions in the guinea pig taenia coli. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**: 1908-1914, 1991.
- VANE, J.R.; GRYGLEWSKI, R.J. & BOTTING, R.M. The endothelial cell as a metabolic and endocrine organ. *Tr. Pharmacol. Sci.*, **8**: 491-496, 1987.
- VAN RENTERGHEM, C.; VIGNE, P.; BARHANIN, J. SCHMIDT-ALLIANA, A.; FRELIN, C. & LADZUNSKI, M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**: 977-985, 1988.
- VIGNE, P.; LAZDUNSKI, M. & FRELIN, C. The inotropic effect of endothelin-1 on rat atria involves hydrolysis of phosphatidylinositol. *FEBS Lett.*, **249**: 143-146, 1989.
- VIGNE, P.; MARSAULT, R.; BREITTMAYER, J.P. & FRELIN, C. Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem. J.*, **266**: 415-420, 1990.
- WALLACE, J.L.; CIRINO, G. & DE NUCCI, G. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am. J. Physiol.*, **256**: G661-G666, 1989a.
- WALLACE, J.L.; KEENAN, C.M. & MACNAUGHTON, W.K. Comparison of the effects of endothelin-1 and endothelin-3 on the rat stomach. *Eur. J. Pharmacol.*, **167**: 41-47, 1989b.
- WARNER, T.D.; DE NUCCI, G. & VANE, J.R. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **159**: 325-326, 1989.
- WARNER, T.D.; D'ORLEANS-JUSTE, P. & VANE, J.R. Endothelin-1 and U46619 potentiate selectively the venous responses to nerve stimulation within the perfused superior mesenteric vascular bed of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**: 745-750, 1990.

- WARNER, T.D.; SCHIIDL, H.H.H.W.; KÜK, J.; MITCHELL, J.A. & MURAD, F. Human brain contains a metalloprotease that converts big endothelin-1 to endothelin-1 and is inhibited by phosphoramidon and EDTA. *Br. J. Pharmacol.* 106: 505-509, 1992.
- 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, 1993a.
- WARNER, T.D.; ALLCOCK, G.H.; MICKLEY, E.J. & VANE, J.R. Characterization of endothelin receptors mediating the effects of the endothelin/sarafotoxin peptides on autonomic neurotransmission in rat vas deferens and guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 783-789, 1993b.
- WHITTLE, B.J.R. & ESPLUGUES, J.V. Induction of rat gastric damage by the endothelium-derived peptide, endothelin. *Br. J. Pharmacol.*, 95: 1011-1013, 1988.
- WIKLUND, N.P.; ÖHLÉN, A. & CEDERQVIST, B. Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in the guinea-pig femoral artery. *Acta Physiol. Scand.*, 134: 311-312, 1988.
- WIKLUND, N.P.; WIKLUND, C.U.; ÖHLÉN, A. & GUSTAFSSON, L.E. Cholinergic neuromodulation by endothelin in guinea pig ileum. *Neuroscience Lett.*, 101: 342-346, 1989a.
- WIKLUND, N.P.; ÖHLÉN, A.; WIKLUND, C.U.; CEDERQVIST, B.; HEDQVIST, P. & GUSTAFSSON, L.E. Neuromuscular actions of endothelin on smooth, cardiac and skeletal muscle from guinea pig, rat and rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, 137: 399-407, 1989b.
- WIKLUND, N.P.; ÖHLÉN, A.; WIKLUND, C.U.; HEDQVIST, P. & GUSTAFSSON, L.E. Endothelin modulation of neuroeffector transmission in rat and guinea pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, 185: 25-33, 1990.

ZIMMERMAN, R.S.; MARTINEZ, A.J.; MACPHEE, A.A. & BARBEE, R.W. Cardio-renal effects of endothelin-3 in the rat. *Life Sci.*, 47: 2323-2332, 1990.