

Modulação dos Efeitos Miocárdicos da Estimulação Selectiva dos Receptores ET_B e suas Implicações na Insuficiência Cardíaca [80]

CARMEN BRÁS-SILVA, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto,
Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2005 ; 24 (9): 1125-1133

RESUMO

Introdução: A endotelina-1 (ET-1) actua através de dois tipos de receptores, ET_A e ET_B. Estudos funcionais recentes sugerem a existência de dois subtipos de receptores ET_B a nível cardíaco: ET_{B1}, de localização endotelial endocárdica e promotores de inotropismo negativo, e ET_{B2}, de localização miocárdica e promotores de inotropismo positivo. No presente estudo investigámos os mecanismos subjacentes aos efeitos miocárdicos da estimulação selectiva dos receptores ET_B.

Material e Métodos: O estudo foi efectuado em músculos papilares direitos de coelhos brancos neo-zelandeses (n = 39; Krebs-Ringer; 1,8 mM CaCl₂; 35 °C). Foram avaliados os efeitos da Sarafotoxina S6c (SRTXc, agonista ET_B; 0,2µM): (i) em músculos com endotélio endocárdico (EE) intacto (n = 6); (ii) em músculos com EE danificado (Triton X100; 0,5 %; n = 6); (iii) na presença de N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA, inibidor das síntese do óxido nítrico; n = 6); (iv) na presença de Indometacina (INDO, inibidor da ciclooxigenase; n = 6); (v) na presença de BQ-123 (antagonista ET_A) com EE intacto (n = 7); (vi) na presença de BQ-123 com EE danificado (n = 8). Apresentam-se apenas os resultados significativos (p < 0,05) expressos em % de variação em relação ao seu valor basal.

Resultados: Em músculos com EE intacto a SRTXc administrada isoladamente induziu efeitos inotrópico e lusitrópico negativos, reduzindo a tensão activa (TA) 11,0 ± 5,6 %, a velocidade máxima de elevação da tensão

ABSTRACT

Modulation of the Myocardial Effects of Selective ET_B Receptor Stimulation and its Implications for Heart Failure

Introduction: Endothelin-1 (ET-1) acts on two types of receptors, ET_A and ET_B. Recent functional studies suggest the existence of two ET_B receptor subtypes in the heart: ET_{B1}, located on endocardial endothelial cells and responsible for negative inotropism, and ET_{B2}, located on myocardial cells and responsible for positive inotropism. The aim of the present study was to investigate the mechanisms underlying the myocardial effects of selective ET_B receptor stimulation.

Methods: The study was performed on right papillary muscles from New Zealand white rabbits (n = 39; Krebs-Ringer; 1.8 mM CaCl₂; 35 °C). The effects of sarafotoxin S6c (SRTXc, ET_B agonist; 0.2µ M) were evaluated in muscles with: (i) intact endocardial endothelium (EE) (n = 6); (ii) damaged EE (Triton X100; 0.5 %; n = 6); (iii) intact EE, in the presence of N^G-nitro-L-arginine (L-NNA, nitric oxide synthase inhibitor; n = 6); (iv) intact EE, in the presence of indomethacin (INDO, cyclooxygenase inhibitor; n = 6); (v) intact EE, in the presence of BQ-123 (ET_A antagonist; n = 7); and (vi) damaged EE, in the presence of BQ-123 (n = 8). Only significant results (mean ± SEM, p < 0.05) are given, expressed as % change from baseline.

Results: In muscles with intact EE, SRTXc alone induced negative inotropic and lusitropic effects, decreasing active tension (AT) by 11.0 ± 5.6 %, maximum velocity of

(dT/dt_{max}) $11,2 \pm 5,9\%$ e a velocidade máxima de queda da tensão (dT/dt_{min}) $11,5 \pm 6,2\%$.

Pelo contrário, em músculos com EE danificado, ou na presença de L-NNA ou de INDO, a SRTXc aumentou a TA $35,2 \pm 11,7\%$, $22,8 \pm 2,9\%$ e $15,2 \pm 3,4\%$, a dT/dt_{max} $29,5 \pm 7,9\%$, $20,1 \pm 2,1\%$ e $13,3 \pm 5,0\%$ e a dT/dt_{min} $28,2 \pm 8,1\%$, $21,2 \pm 3,8\%$ e $12,3 \pm 2,2\%$, respectivamente.

Na presença de EE intacto, os efeitos inotrópico e lusitrópico negativos desencadeados pela estimulação ET_B foram potenciados após inibição ET_A , sendo que a TA diminuiu $27,0 \pm 7,4\%$, a dT/dt_{max} $13,3 \pm 4,9\%$ e a dT/dt_{min} $31,1 \pm 7,9\%$. Por outro lado, os efeitos inotrópico e lusitrópico positivos da SRTXc na ausência de EE, foram revertidos na presença de bloqueio ET_A (TA diminuiu $9,0 \pm 1,8\%$, a dT/dt_{max} $4,1 \pm 3,5\%$, a dT/dt_{min} $8,1 \pm 3,6\%$).

Conclusões: Este estudo demonstra que os efeitos inotrópico e lusitrópico mediados pelos receptores ET_B são modulados pelo endotélio endocárdico e pela actividade dos receptores ET_A . Estes resultados poderão ter implicações fisiopatológicas e terapêuticas na Insuficiência Cardíaca, síndrome em que os níveis de ET-1 estão aumentados e a disfunção endotelial poderá estar presente.

Palavras-Chave

Endotelina-1; Receptores ET_B ; Inotropismo; Lusitropismo; Endotélio; Miocárdio

tension rise (dT/dt_{max}) by $11,2 \pm 5,9\%$ and maximum velocity of tension decline (dT/dt_{min}) by $11,5 \pm 6,2\%$. However, after removal of EE, or in the presence of L-NNA or INDO, SRTXc increased AT by $35,2 \pm 11,7\%$, $22,8 \pm 2,9\%$ and $15,2 \pm 3,4\%$, dT/dt_{max} by $29,5 \pm 7,9\%$, $20,1 \pm 2,1\%$ and $13,3 \pm 5,0\%$, and dT/dt_{min} by $28,2 \pm 8,1\%$, $21,2 \pm 3,8\%$ and $12,3 \pm 2,2\%$, respectively. In muscles with intact EE and in the presence of BQ-123, the negative inotropic and lusitropic effects of SRTXc were enhanced: AT decreased by $27,0 \pm 7,4\%$, dT/dt_{max} by $13,3 \pm 4,9\%$ and dT/dt_{min} by $31,1 \pm 7,9\%$. On the other hand, the positive inotropic and lusitropic effects of SRTXc in the absence of intact EE were reversed in the presence of ET_A blockade: AT decreased by $9,0 \pm 1,8\%$, dT/dt_{max} by $4,1 \pm 3,5\%$ and dT/dt_{min} by $8,1 \pm 3,6\%$.

Conclusions: The present study shows that the inotropic and lusitropic effects mediated by ET_B receptors are modulated by endocardial endothelium and by ET_A receptor activity. These results may have pathophysiological and therapeutic implications in heart failure, a condition in which ET-1 levels are increased and endothelial dysfunction may be present.

Key words

Endothelin-1; ET_B receptors; Inotropy; Lusitropy; Endothelium; Myocardium

INTRODUÇÃO

A endotelina-1 (ET-1) é um polipeptídeo vasoactivo, identificado originalmente em células endoteliais vasculares⁽¹⁾. A nível cardiovascular este peptídeo pode ser sintetizado não só pelo endotélio (vascular e endocárdico), mas também pelo músculo liso e células miocárdicas⁽²⁾.

A ET-1 é considerada um regulador local (autócrino e parácrino), uma vez que a sua libertação é predominantemente abluminal e a sua semivida é curta⁽³⁾. Não obstante, os níveis plasmáticos, salivares e tecidulares cardíacos de ET-1 encontram-se aumentados na Insuficiência Cardíaca (IC), correlacionam-se positivamente com a gravidade da doença e negativamente com o prognóstico⁽³⁾.

INTRODUCTION

Endothelin-1 (ET-1) is a vasoactive polypeptide, first identified in vascular endothelial cells⁽¹⁾. In the heart, this peptide can be produced not only by the vascular and endocardial endothelium, but also by smooth muscle and myocardial cells⁽²⁾.

ET-1 is considered a local regulator (auto-crine and paracrine), since its release is predominantly abluminal and it has a short half-life⁽³⁾. However, ET-1 concentrations in plasma, saliva and cardiac tissue are elevated in heart failure, and correlate positively with the severity of the disease and negatively with prognosis⁽³⁾.

In mammals the biological activity of ET-1 is mediated by two types of receptor, ET_A and ET_B , both belonging to the superfamily of G

Nos mamíferos a actividade biológica da ET-1 é mediada por dois tipos de receptores, ET_A e ET_B, ambos pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteínas G. Quando estimulados, os receptores ET_A, presentes em maior percentagem no tecido cardíaco, promovem vasoconstrição, aumento do inotropismo e mitogénese^(2,4). Além disso, como recentemente demonstrámos, a activação deste tipo de receptores conduz a um aumento da distensibilidade em situações de sobrecarga⁽⁵⁾. Por outro lado, a estimulação dos receptores ET_B induz vasodilatação, mediada pela libertação de óxido nítrico e de prostaciclina, e tem efeitos inibitórios do crescimento associados a apoptose. Este tipo de receptores é também responsável pela depuração pulmonar da ET-1 circulante e pela sua recaptação pelas células endoteliais⁽²⁾. A nível vascular é ainda possível subdividir os receptores ET_B, em ET_{B1} de localização endotelial e promotores de vasodilatação e em ET_{B2} de localização muscular e promotores de vasoconstrição venosa⁽⁴⁾.

Descrevemos, recentemente, os efeitos miocárdicos resultantes da estimulação selectiva dos receptores ET_B^(6,7). No presente estudo, investigámos os mecanismos subcelulares que lhes estão subjacentes, bem como a sua modulação pelo endotélio endocárdico e pela estimulação dos receptores ET_A.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação experimental

O estudo foi realizado em músculos papilares isolados do ventrículo direito de coelhos brancos neo-zelandeses (*Oryctolagus cuniculus*; n = 39). Os animais foram anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg, *iv*), o coração rapidamente excisado e os músculos papilares dissecados e imediatamente colocados numa solução de Krebs-Ringer (composição em mM: NaCl 98; KCl 4,7; MgSO₄ 2,4; KH₂PO₄ 1,2; glicose 4,5; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 20; C₂H₃NaO₃ 15; atenolol 0,02) a 35 °C com a substância cardioplégica BDM (C₄H₂NO₂) a 3 %. Os músculos papilares foram montados verticalmente em banho próprio e conectados a um transdutor isotónico/isométrico (University of Antwerp, Belgium). Após 10 minutos iniciou-se a estimulação eléctrica com uma frequência de 0,6 Hz durante mais 10 minutos, ao fim dos quais se procedeu à substituição da solução com BDM por outra de composição semelhante, mas sem BDM. Os múscu-

los protein-coupled receptors. When stimulated, ET_A receptors, found mainly in cardiac tissue, promote vasoconstriction, increased inotropy and mitogenesis^(2,4). In addition, as we have recently demonstrated, activation of this type of receptor increases distensibility of acutely loaded myocardium⁽⁵⁾. Stimulation of ET_B receptors, on the other hand, induces vasodilation, through release of nitric oxide and prostacyclins, and inhibits growth through apoptosis. These receptors are also responsible for pulmonary depuration of circulating ET-1 and its reuptake by endothelial cells⁽²⁾. In the heart, ET_B receptors can be further divided into two subtypes: ET_{B1} located on endocardial endothelial cells and responsible for negative inotropism, and ET_{B2} located on myocardial cells and responsible for positive inotropism⁽⁴⁾.

In recent studies, we described the myocardial effects of selective ET_B receptor stimulation^(6,7). The aim of the present study was to investigate the subcellular mechanisms underlying these effects, as well as their modulation by endocardial endothelium and by ET_A receptor stimulation.

METHODS

Experimental preparation

The study was performed on right ventricular papillary muscles from New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*; n = 39). The animals were anesthetized with pentobarbital (25 mg/kg, *iv*), the heart was rapidly excised, and the papillary muscles dissected and immediately placed in Krebs-Ringer solution (composition in mM: NaCl 98; KCl 4.7; MgSO₄ 2.4; KH₂PO₄ 1.2; glucose 4.5; CaCl₂ 1.8; NaHCO₃ 20; C₂H₃NaO₃ 15; atenolol 0.02) at 35 °C, together with the cardioplegic agent BDM (C₄H₂NO₂) at 3 %. The papillary muscles were mounted vertically in a special vessel and connected to an isotonic/isometric transducer (University of Antwerp, Belgium) for 10 minutes. Electrical stimulation was then begun, at a frequency of 0.6 Hz, for a further 10 minutes, after which the solution was replaced with one of a similar composition but without BDM. The muscles then began to contract with a preload estimated according to their size, and an afterload of around 10 % of preload. After stabilization (2 hours), L_{max}, which is the muscle length at rest that determines maximum active tension, was determined.

los começaram então a contrair com uma pré-carga estimada de acordo com as suas dimensões, e com uma pós-carga correspondente a cerca de 10% da pré-carga. Após estabilização (2 horas) determinou-se o L_{max} , ou seja, o comprimento muscular em repouso que determina uma tensão activa máxima. Depois de um novo período de estabilização mais curto (30 minutos) deu-se início ao protocolo experimental.

Protocolo experimental

Os efeitos da estimulação selectiva dos receptores ET_B sobre a contractilidade miocárdica foram estudados em músculos papilares através da administração de Sarafotoxina S6c (SRTXc; agonista ET_B , 0,2 μ M), em diversas condições experimentais: (i) endotélio endocárdico (EE) intacto (n=6); (ii) EE danificado (n=6); (iii) EE intacto, na presença de um inibidor da síntese do NO, N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA; 10 μ M; n=6); (iv) EE intacto, na presença de um inibidor da ciclooxigenase, Indometacina (INDO; 10 μ M; n=6); (v) na presença de EE e de um antagonista selectivo dos receptores ET_A , BQ-123 (10 μ M; n=7); (vi) na ausência de EE e após antagonismo selectivo dos receptores ET_A , BQ-123 (10 μ M; n=8). O EE foi danificado através de uma imersão breve (1s) do músculo papilar numa solução detergente, Triton X-100 (0,5%).

Todos os fármacos foram adquiridos à *Sigma Chemical Co, St Louis, Mo*.

Análise dos dados

Foram registadas e analisadas contracções isotónicas e isométricas antes e depois da adição de cada um dos fármacos. A partir dos sinais registados em computador obtivemos os seguintes parâmetros: (1) tensão muscular activa máxima (TA, mN/mm²); (2) L_{max} , mm; (3) fracção de encurtamento (FE, % de L_{max}); (4) velocidades máximas de elevação (dT/dt_{max} , mN/mm².s) e de queda (dT/dt_{min} , mN/mm².s) da tensão muscular; (5) velocidades máximas de encurtamento (dL/dt_{max} , L_{max}/s) e de reextensão (dL/dt_{min} , L_{max}/s) muscular; (6) intervalo de tempo entre o início do abalo muscular e: i) o momento em que a tensão activa caiu para metade do seu valor inicial (tHR, ms); ii) o encurtamento máximo (tPS, ms). O tHR e o tPS reflectem a duração das contracções isométricas e isotónicas, respectivamente.

Following a further, shorter period of stabilization (30 minutes), the experimental protocol was begun.

Experimental protocol

The effects of selective stimulation of ET_B receptors on myocardial contractility were studied in the papillary muscles by adding sarafotoxin S6c (SRTXc; ET_B agonist, 0.2 μ M) in various experimental conditions: (i) intact endocardial endothelium (EE) (n=6); (ii) damaged EE (n=6); (iii) intact EE, in the presence of the nitric oxide synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginin (L-NNA; 10 μ M; n=6); (iv) intact EE, in the presence of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (INDO; 10 μ M; n=6); (v) intact EE, in the presence of the selective ET_A receptor antagonist BQ-123 (10 μ M; n=7); and (vi) damaged EE, in the presence of BQ-123 (10 μ M; n=8). The EE was damaged by brief immersion (1 s) of the papillary muscle in a detergent solution of Triton X-100 (0.5%).

All the agents were acquired from Sigma Chemical Co, St. Louis, MO.

Data analysis

Isotonic and isometric contractions were recorded and analyzed before and after addition of each of the agents. Based on the signals recorded by computer, the following parameters were calculated: 1) maximum active tension (AT, mN/mm²); 2) L_{max} (mm); 3) fractional shortening (FS, % of L_{max}); 4) maximum velocity of tension rise (dT/dt_{max} , mN/mm².s) and tension decline (dT/dt_{min} , mN/mm².s); 5) maximum velocity of shortening (dL/dt_{max} , L_{max}/s) and lengthening (dL/dt_{min} , L_{max}/s); 6) interval between beginning of muscle twitch and: i) time of half relaxation (tHR, ms); and ii) time of peak shortening (tPS, ms). tHR and tPS correspond to the duration of isometric and isotonic contractions respectively.

Statistical analysis

The results were presented as means \pm standard error and assessed by analysis of variance, the most appropriate ANOVA test being selected for each experimental protocol. The Student-Newman-Keuls test was used for multiple paired comparisons whenever ANOVA analysis revealed statistically significant differences ($p < 0.05$).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão e avaliados por análise de variância, tendo-se seleccionado o teste ANOVA mais adequado para cada protocolo experimental. Utilizou-se o teste de Student-Newman-Keuls para efectuar comparações múltiplas emparelhadas, sempre que o teste ANOVA revelava diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os valores médios dos parâmetros contrácteis dos músculos papilares com EE intacto ($n=25$), em condições basais, foram semelhantes em todos os protocolos experimentais: TA $25,8 \pm 2,5$ mN/mm²; dT/dt_{max} $169,0 \pm 18$ mN/mm².s; dT/dt_{min} $-124,4 \pm 10,7$ mN/mm².s; PS $14,6 \pm 0,02$ % of L_{max}; dL/dt_{max} $0,85 \pm 0,06$ L_{max}.s⁻¹; dL/dt_{min} $-3,4 \pm 0,26$ L_{max}.s⁻¹; tHR $413,1 \pm 11,9$ ms. A remoção do EE resultou na redução do inotropismo e do lusitropismo. Os valores médios dos parâmetros contrácteis dos músculos papilares com EE danificado ($n=14$) foram: TA $18,0 \pm 2,3$ mN/mm²; dT/dt_{max} $109,7 \pm 11,6$ mN/mm².s; dT/dt_{min} $-85,7 \pm 9,8$ mN/mm².s; PS $10,1 \pm 0,1$ % of L_{max}; dL/dt_{max} $0,65 \pm 0,07$ L_{max}.s⁻¹; dL/dt_{min} $-2,26 \pm 0,255$ L_{max}.s⁻¹; tHR $433,2 \pm 14,1$ ms.

Apresentam-se apenas os resultados da análise das contracções isométricas, uma vez que a análise das contracções isotónicas não forneceu informações adicionais.

A administração de SRTXc ($0,2\mu\text{M}$) induziu um efeito inotrópico negativo nos músculos com EE intacto, reduzindo a TA $11,0 \pm 5,6$ %, a dT/dt_{max} $11,2 \pm 5,9$ %, a dT/dt_{min} $11,5 \pm 6,2$ %. Pelo contrário, em músculos com EE danificado, ou na presença de L-NNA, ou de INDO, a SRTXc induziu efeitos inotrópicos e lusitropicos positivos. Em músculos com EE danificado esta concentração de SRTXc aumentou a TA $35,2 \pm 11,7$ %, a dT/dt_{max} $29,5 \pm 7,9$ %, a dT/dt_{min} $28,2 \pm 8,1$ %. Na presença de L-NNA, a SRTXc aumentou a TA $22,8 \pm 2,9$ %, a dT/dt_{max} $20,1 \pm 2,1$ % e a dT/dt_{min} $21,2 \pm 3,8$ %; enquanto que na presença de INDO, o mesmo agente induziu um aumento de $15,2 \pm 3,4$ % na TA, de $13,3 \pm 5,0$ % na dT/dt_{max} e de $12,3 \pm 2,2$ % na dT/dt_{min} (Fig. 1). O efeito inotrópico negativo desencadeado pela estimulação ET_B foi potenciado após inibição ET_A, sendo que a TA diminuiu $27,0 \pm 7,4$ %, a dT/dt_{max} $13,3 \pm 4,9$ % e a dT/dt_{min} $31,1 \pm 7,9$ %. Por outro lado, os efeitos

RESULTS

Mean values of contractile parameters in papillary muscle with intact EE ($n=25$) were similar in all the experimental protocols under baseline conditions: AT 25.8 ± 2.5 mN/mm²; dT/dt_{max} 169.0 ± 18 mN/mm².s; dT/dt_{min} -124.4 ± 10.7 mN/mm².s; PS 14.6 ± 0.02 % of L_{max}; dL/dt_{max} 0.85 ± 0.06 L_{max}.s⁻¹; dL/dt_{min} -3.4 ± 0.26 L_{max}.s⁻¹; tHR 413.1 ± 11.9 ms. Removal of EE resulted in decreased inotropy and lusitropy. Mean values of contractile parameters in papillary muscles with damaged EE ($n=14$) were: AT 18.0 ± 2.3 mN/mm²; dT/dt_{max} 109.7 ± 11.6 mN/mm².s; dT/dt_{min} -85.7 ± 9.8 mN/mm².s; PS 10.1 ± 0.1 % of L_{max}; dL/dt_{max} 0.65 ± 0.07 L_{max}.s⁻¹; dL/dt_{min} -2.26 ± 0.255 L_{max}.s⁻¹; tHR 433.2 ± 14.1 ms.

Only the results of the analysis of isometric twitches are presented since analysis of isotonic twitches did not provide any additional information.

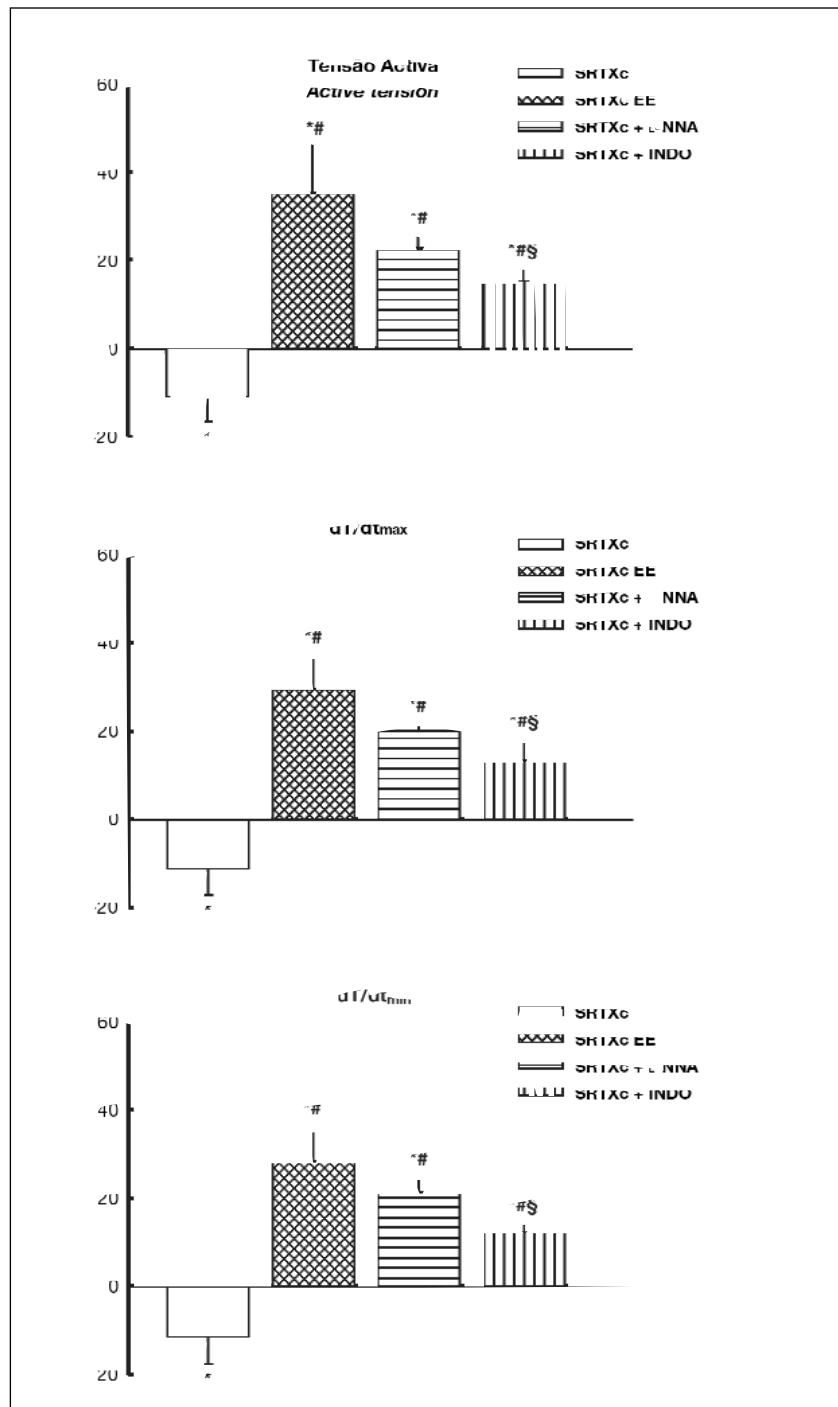
The addition of SRTXc (0.2 M) induced a negative inotropic effect in the muscles with intact EE, reducing AT by 11.0 ± 5.6 %, dT/dt_{max} by 11.2 ± 5.9 %, and dT/dt_{min} by 11.5 ± 6.2 %. By contrast, in muscles with damaged EE or in the presence of L-NNA or INDO, SRTXc produced positive inotropic and lusitropic effects. In muscles with damaged EE, this concentration of SRTXc increased AT by 35.2 ± 11.7 %, dT/dt_{max} by 29.5 ± 7.9 %, and dT/dt_{min} by 28.2 ± 8.1 %. In the presence of L-NNA, SRTXc increased AT by 22.8 ± 2.9 %, dT/dt_{max} by 20.1 ± 2.1 % and dT/dt_{min} by 21.2 ± 3.8 %; while in the presence of INDO, it induced an increase of 15.2 ± 3.4 % in AT, 13.3 ± 5.0 % in dT/dt_{max} and 12.3 ± 2.2 % in dT/dt_{min} (Fig. 1). The negative inotropic effect produced by ET_B stimulation was enhanced after ET_A blockade, with AT decreasing by 27.0 ± 7.4 %, dT/dt_{max} by 13.3 ± 4.9 % and dT/dt_{min} by 31.1 ± 7.9 %. On the other hand, the positive inotropic and lusitropic effects of SRTXc with damaged EE were reversed in the presence of ET_A blockade (AT decreased by 9.0 ± 1.8 %, dT/dt_{max} by 4.1 ± 3.5 %, and dT/dt_{min} by 8.1 ± 3.6 % (Fig. 2).

DISCUSSION

This study investigated the mechanisms underlying the effects of selective ET_B receptor stimulation. We have previously demonstrated that receptor stimulation induces a negative inotropic effect^(6,7). The present study confirmed

Fig. 1 Efeitos da estimulação selectiva dos receptores ET_B ($0,2\mu M$), nas várias condições experimentais: SRTXc - Sarafotoxina S6c, músculos com endotélio endocárdico (EE) intacto; SRTXc EE - Sarafotoxina S6c, músculos com EE danificado; SRTXc + L-NNA - Sarafotoxina S6c, músculos com EE intacto na presença de N^G -Nitro-L-Arginina; SRTXc + INDO - Sarafotoxina S6c, músculos com EE intacto na presença de Indometacina. * $p < 0,05$ vs valor basal; # $p < 0,05$ vs. SRTXc; § $p < 0,05$ vs. SRTXc EE.

Fig. 1 Effects of selective stimulation of ET_B receptors ($0,2\mu M$), in various experimental conditions: SRTXc - sarafotoxin S6c, in muscles with intact endothelial endothelium (EE); SRTXc EE - sarafotoxin S6c, muscles with damaged EE; SRTXc + L-NNA - sarafotoxin S6c, muscles with intact EE in the presence of N^G -nitro-L-arginin; SRTXc + INDO - sarafotoxin S6c, muscles with intact EE in the presence of indomethacin. * $p < 0,05$ vs. baseline value; # $p < 0,05$ vs. SRTXc; § $p < 0,05$ vs. SRTXc EE.



inotrópico e lusitrópicos positivos da SRTXc na ausência de EE, foram revertidos na presença de bloqueio ET_A (TA diminuiu $9,0 \pm 1,8\%$, a dT/dt_{max} $4,1 \pm 3,5\%$, a dT/dt_{min} $8,1 \pm 3,6\%$ (Fig. 2).

DISCUSSÃO

Este estudo permitiu investigar os mecanismos moduladores dos efeitos da estimulação selectiva dos receptores tipo B da $ET-1$. Demonstrámos anteriormente que, a activação dos

that this effect is mediated by the endothelium, nitric oxide (NO) and prostaglandins and modulated by ET_A receptor activity.

Cardiac endothelium, both coronary vascular and endocardial, modulates performance of underlying cardiac muscle. This modulation is mediated by the release of by the release of various substances, particularly $ET-1$, NO and prostaglandins⁽⁸⁾. At the vascular level, ET_B re-

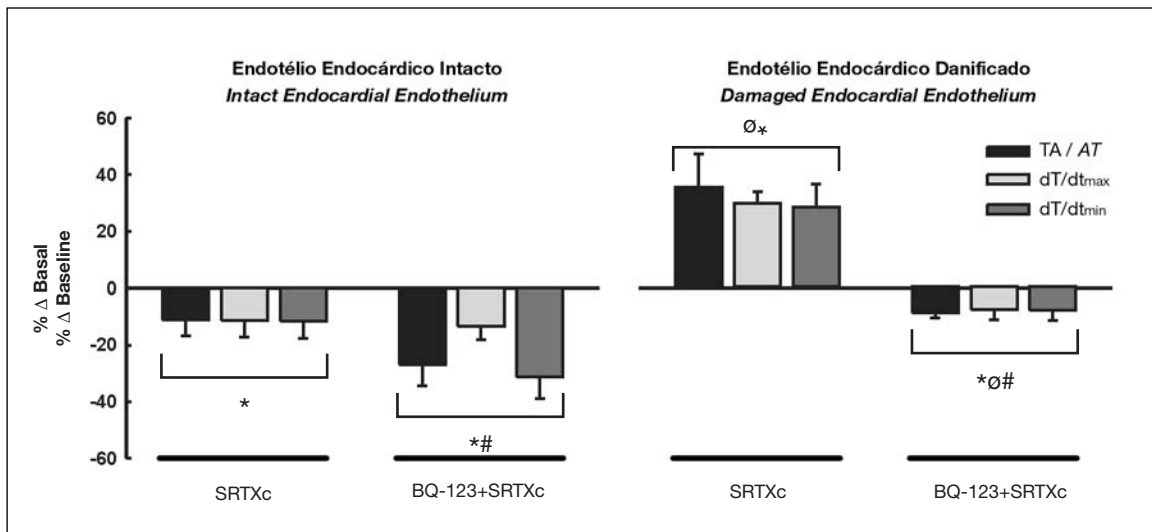


Fig. 2 Efeitos da estimulação selectiva dos receptores ET_B ($0,2\mu M$) pela Sarafotoxina S6c (SRTXc), na ausência e na presença de BQ-123 em músculos papilares com endotélio endocárdico intacto e danificado. * $p < 0,05$ vs. Basal; $^{\circ}p < 0,05$ vs. EE Intacto; # $p < 0,05$ vs. SRTXc.

Fig. 2 Effects of selective stimulation of ET_B receptors ($0,2\mu M$) with sarafotoxin S6c (SRTXc), in the absence and presence of BQ-123, in papillary muscles with intact and damaged endocardial endothelium. * $p < 0.05$ vs. baseline value; $^{\circ}p < 0.05$ vs. intact EE; # $p < 0.05$ vs. SRTXc.

receptores ET_B induz um efeito inotrópico negativo^(6, 7). No presente estudo, confirmámos que este efeito é mediado pelo endotélio, NO e prostaglandinas e constatámos que é modulado pela estimulação dos receptores ET_A .

O endotélio cardíaco, vascular coronário e endocárdico, é um importante modulador da função miocárdica. Esta modulação é mediada pela libertação de várias substâncias, nomeadamente, ET-1, NO e prostaglandinas⁽⁸⁾. A nível vascular, os receptores ET_B podem ser classificados em ET_{B1} de localização endotelial e promotores de vasodilatação (através da libertação de NO e prostaglandinas) e em ET_{B2} de localização muscular e promotores de vasoconstricção venosa⁽⁴⁾. Como recentemente demonstrámos através de estudos funcionais, no coração ocorre uma distribuição semelhante dos receptores ET_B (ET_{B1} nas células do endotélio endocárdico e ET_{B2} nos cardiomiócitos), e portanto o efeito inotrópico negativo resultante da estimulação ET_B , quando o EE está intacto, poderá ser explicado pela libertação de NO e prostaglandinas mediada pelos receptores ET_{B1} . Por outro lado, o aumento da contractilidade observado na presença de um EE danificado poderá ser atribuída à estimulação ET_{B2} . Assim, a estimulação ET_B com SRTXc, que activa ambos os subtipos, ET_{B1} e ET_{B2} , induziu um efeito inotrópico positivo em músculos com EE danificado, ou após bloqueio da síntese de NO ou de pros-

ceptors can be classified into two subtypes: ET_{B1} , located in endothelium, which promotes vasodilation (through release of NO and prostaglandins), and ET_{B2} , located in muscle cells, which promotes venous vasoconstriction⁽⁴⁾. As we recently showed in functional studies, the two types of ET_B receptors have a similar distribution in the heart (ET_{B1} in endocardial endothelial cells and ET_{B2} in cardiomyocytes), and so the negative inotropic effect of ET_B stimulation in intact EE may be explained by the release of NO and prostaglandins mediated by ET_{B1} receptors. On the other hand, the increased contractility observed in the presence of damaged EE may be attributed to ET_{B2} activity. Thus, ET_B stimulation with SRTXc, which activates both ET_{B1} and ET_{B2} subtypes, induced positive inotropic effects in muscles with damaged EE or following NO synthase or prostaglandin inhibition. This effect may be explained by activation of ET_{B2} since the endothelial receptors (ET_{B1}) were no longer available.

ET-1 also stimulates the release of prostaglandins. These act by binding to specific G protein-coupled receptors linked to second messenger systems, particularly cyclic AMP. Their direct action on the myocardium is poorly understood, since both positive⁽⁹⁾ and negative⁽¹⁰⁾ inotropic effects have been demonstrated in isolated papillary muscles. However, the former

taglandinas. Este efeito pode ser explicado pela activação ET_{B2} já que os receptores endoteliais (ET_{B1}) não se encontravam disponíveis.

A ET-1 estimula também a libertação de prostaglandinas. Estas actuam através da ligação a receptores específicos acoplados, via proteínas G, a sistemas de segundos mensageiros, sobretudo ao AMPcíclico. As suas acções directas sobre o miocárdio estão pouco esclarecidas, tendo sido demonstrados em músculos papilares isolados efeitos inotrópicos quer positivos⁽⁹⁾ quer negativos⁽¹⁰⁾. Todavia, os primeiros foram observados apenas aquando da inibição da síntese de NO⁽⁹⁾. Esta interacção entre NO e prostaglandinas libertadas pelo EE, poderá ajudar a explicar a razão pela qual no nosso estudo a estimulação ET_B após inibição da síntese de NO ou de prostaglandinas resultou em efeitos inotrópicos e lusitropicos positivos. Para além disso, estes efeitos podem ser explicados pelo balanço dos efeitos relativos da estimulação dos receptores endoteliais (ET_{B1}) e musculares (ET_{B2}). Na presença de EE intacto os efeitos da estimulação ET_{B1} predominam observando-se uma diminuição na contractilidade. Quando a síntese de NO e prostaglandinas é inibida, para além da interacção acima descrita, os efeitos desencadeados pela SRTXc são provavelmente mediados pelos receptores ET_{B2} . Por fim, quando o EE é danificado, os agonistas ET_B actuarão preferencialmente nos receptores ET_{B2} induzindo efeito inotrópico positivo.

Constatámos também no presente estudo que após inibição ET_A , os efeitos inotrópico e lusitropicos negativos desencadeados pela estimulação ET_B foram potenciados, correspondendo provavelmente aos efeitos mediados pelos receptores ET_B endoteliais sem oposição dos efeitos mediados pelos receptores musculares. Por outro lado, na ausência de EE, os efeitos inotrópico e lusitropicos positivos da SRTXc, foram revertidos, para ligeiramente negativos, reflectindo potencial estimulação dos receptores ET_B endoteliais vasculares. Esta modulação, cujos mecanismos estão ainda por esclarecer, sugere a existência de interacção entre os dois tipos de receptores da ET-1, nomeadamente por heterodimerização, ou acoplamento entre as vias de transdução que lhes estão subjacentes.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que os efeitos inotrópico e lusitropicos negativos induzidos pela acti-

have only been observed with NO synthase inhibition⁽⁹⁾. This interaction between NO and prostaglandins released by EE may partly explain why in our study ET_B stimulation following NO synthase or prostaglandin inhibition resulted in positive inotropic and lusitropic effects. In addition, these effects may be explained by the balance of the relative effects of endothelial (ET_{B1}) and muscle (ET_{B2}) receptor stimulation. In the presence of intact EE, the effects of ET_{B1} stimulation predominate, with a decrease in contractility. In the presence of NO synthase or prostaglandin inhibition, besides the interaction described above, the effects triggered by SRTXc are probably mediated by ET_{B2} receptors. Finally, with damaged EE, ET_B agonists will act preferentially on ET_{B2} receptors, producing a positive inotropic effect.

The present study also found that following ET_A blockade, the negative inotropic and lusitropic effects of ET_B stimulation were enhanced, probably as a result of effects mediated by endothelial ET_B receptors not being counteracted by those produced by muscle receptors. On the other hand, in the absence of intact EE, the positive inotropic and lusitropic effects of SRTXc were reversed, becoming slightly negative, reflecting possible stimulation of vascular endothelial ET_B receptors. This modulation, whose mechanisms have yet to be clarified, suggests that there is an interaction between the two types of ET-1 receptor, probably by heterodimerization or coupling between the transduction pathways that underlie them.

CONCLUSIONS

The present study shows that the negative inotropic and lusitropic effects mediated by ET_B receptor stimulation require the presence of intact endocardial endothelium; they are enhanced by ET_A blockade and mediated by the release of NO and prostaglandins. On the other hand, the positive inotropic and lusitropic effects induced by ET_B stimulation after removal of EE require the presence of active ET_A receptors. These results may have pathophysiological and therapeutic implications in cardiovascular disease, particularly heart failure, a condition in which ET-1 levels are increased and endothelial dysfunction may be present.

vação dos receptores ET_B requerem a presença de um endotélio endocárdico intacto, são potenciados pela inibição dos receptores ET_A e mediados pela libertação de NO e de prostaglandinas. Por outro lado, os efeitos inotrópico e lusitrópico positivos induzidos pela estimulação ET_B após destruição do EE, requerem a presença de receptores ET_A activos. A relevância destes resultados está relacionada com as implicações fisiopatológicas e terapêuticas na doença cardiovascular, nomeadamente na Insuficiência Cardíaca, síndrome em que os níveis de ET-1 estão aumentados e a disfunção endotelial está presente.

AGRADECIMENTOS

Trabalho subsidiado por bolsas da Fundação para Ciência e Tecnologia (projecto n.º PRAXIS/C/SAU/11301/98; parcialmente financiado pelo FEDER) e da Fundação Calouste Gulbenkian, através da Unidade I&D Cardiovascular (51/94-FCT, Portugal). Os autores agradecem o apoio técnico competente da D. Rosa Gonçalves e da D. Francelina Melo.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Foundation for Science and Technology (project no. PRAXIS/C/SAU/11301/98; partly funded by FEDER) and the Calouste Gulbenkian Foundation, through the Cardiovascular R&D Unit (51/94-FCT, Portugal). The authors would like to thank Rosa Gonçalves and Francelina Melo for their excellent technical support.

Pedidos de separatas para:
Address for reprints:

ADELINO F. LEITE-MOREIRA
Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
4200-319 PORTO, PORTUGAL
e-mail: amoreira@med.up.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
2. Russell FD, Molenaar P. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:353-9.
3. Krum H, Denver R, Tzanidis A, Martin P. Diagnostic and therapeutic potential of the endothelin system in patients with chronic heart failure. *Heart Fail Rev* 2001;341-52.
4. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Nozota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci* 1998;62:1485-9.
5. Leite-Moreira AF, Brás-Silva C, Pedrosa C, Rocha-Sousa A. ET-1 increases distensibility of acutely loaded myocardium: a novel ETA and Na⁺/H⁺ exchanger-mediated effect. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2003;284:H1332-9.
6. Leite-Moreira AF, Bras-Silva C, Pedrosa C. Efeitos Miocárdicos da estimulação dos receptores tipo B da Endotelina-1. *Rev Port Cardiol* 2002;21(9):1009-16.
7. Leite-Moreira AF, Bras-Silva C. Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2004;287:H1194-9.
8. Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 2003;83(1):59-115.
9. Mohan P, Brutsaert DL, Sys SU. Myocardial performance is modulated by interaction of cardiac endothelium derived nitric oxide and prostaglandins. *Cardiovasc Res* 1995; 29(5):637-40.
10. Schror K, Hohlfeld T. Inotropic actions of eicosanoids. *Basic Res Cardiol* 1992;87(1):2-11.