

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DOS PROSTANÓIDES
E DO CÁLCIO NA CONTRATILIDADE DA
VESÍCULA BILIAR ÀS ENDOTELINAS**

ALCÍBIA HELENA DE AZEVEDO MAIA

Tese apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Farmacologia do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito à obtenção
do título de Doutor em Farmacologia.

Florianópolis – SC
Dezembro/2001

MAIA, Alcibia H. de A. *Participação dos prostanóides e do cálcio na contratilidade da vesícula biliar às endotelinas*. Florianópolis, 2001. 114f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Giles Alexander Rae.
Defesa: 17/12/2001.

O estudo avalia as ações contráteis das [endotelinas] (ETs) na [vesícula biliar] (VB) de [cobaia], comparando-as com aquelas da VB de [coelho], bem como o papel de [prostanóides] e do [cálcio intracelular] nas contrações induzidas através de receptores ET_A e ET_B. A ET-1 é um potente agonista contrátil da VB de coelho, que parece expressar um predomínio maior de receptores ET_B sobre os ET_A do que a VB de cobaia. Os prostanóides são importantes na mediação/modulação dos efeitos contráteis das ETs na VB de cobaia, pois a [indometacina] (INDO) inibe as contrações por elas induzidas, e esses peptídeos estimulam a produção de prostaciclina. As contrações tônicas induzidas pelas ETs na VB de cobaia correlacionam-se a aumentos proporcionais da concentração de cálcio intracelular livre. Os perfis inibitórios da INDO sobre as contrações e aumentos da fluorescência induzidas pelas ETs na VB de cobaia sugerem que receptores ET_A e ET_B sinalizam a produção de conjuntos distintos de prostanóides que exercem influências inibitórias e excitatórias na contratilidade do músculo liso, respectivamente. A relevância fisiológica e/ou fisiopatológica destes achados permanece a ser esclarecida.

[endotelinas], [vesícula biliar], [indometacina], [prostanóides], [cálcio intracelular], [receptores endotelinérgicos], [cobaia], [coelho].

**“PARTICIPAÇÃO DOS PROSTANÓIDES E DO CÁLCIO NA
CONTRATILIDADE DA VESÍCULA BILIAR ÀS ENDOTELINAS”**

POR

ALCÍBIA HELENA DE AZEVEDO MAIA

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

Banca Examinadora:



Giles Alexander Rae

FMC/UFSC-(Orientador)



Lusiane Bendhack

USP/RP



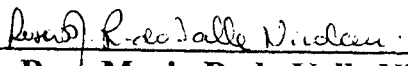
Rita Tostes Passaglia

USP/SP



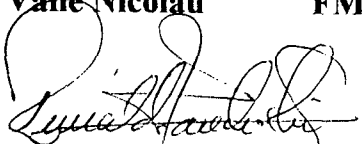
João Batista Calixto

FMC/UFSC



Rosa Maria R. do Valle Nicolau

FMC/UFSC


Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 17 de dezembro de 2001.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Esta Tese foi realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Brasil) e no Instituto de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Sherbrooke (Canadá) durante o Curso de Pós-graduação em Farmacologia, nível Doutorado, com o auxílio financeiro da CAPES.

Dedicatórias Especiais

Aos meus filhos, Rodrigo e Camila,
pela paciência, compreensão e tolerância
demonstradas durante esse período atribulado
que foi minha Pós-graduação.

Aos meus pais, Ivo Maia e
Antônia de Azevedo Maia (in memoriam)
exemplos de força interior, pela formação
apoio e por tanto amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, meu especial agradecimento por acreditar que eu chegaria até aqui. Muito obrigada pelo exemplo, orientação, amizade e incentivo ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro D'Orléans-Juste pela carinhosa acolhida e atenção dispensada.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, pelo conhecimento transmitido e amizade.

Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, pelo carinho e auxílio, de modo especial à Rosane Ostrosky, Pedro Paulo de Souza, Adenir Pereira e Elza Ramos.

A minha eterna gratidão aos Professores da Universidade do Vale do Itajaí, Adair Roberto Soares dos Santos e Márcia Maria de Souza, pela disposição de me ajudar a driblar mais um obstáculo. Um raro exemplo de solidariedade e amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus grandes amigos Cristiano Scheidt e Cláudio Laurentino Guimarães por terem sido muitíssimo prestativos nas ocasiões em que necessitei de assessoria.

Às amigas da Pós-Graduação Eunice André, Anna Paula Piovezan, Monique Gevaerd, Daniela Cabrini e Elizabeth Wazlawik pelo suporte sem restrições nos momentos difíceis e pelos "ombros amigos".

À Josélia e Janice pelo excelente relacionamento e agradável clima de trabalho

Ao Michel Otuki pela confecção de um esquema para a apresentação da dissertação.

À Universidade do Vale do Itajaí, especialmente ao Coordenador do Curso de Farmácia, Prof. Rogério Corrêa, pelo apoio incondicional.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	i
Lista de figuras e tabelas.....	ii
Resumo.....	vi
Abstract.....	ix
Publicações.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Papel da vesícula biliar.....	1
1.2. As endotelinas, vias de biosíntese, seus receptores e mecanismos de sinalização celular.....	6
1.3. Endotelinas no sistema hepato-biliar.....	21
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Animais.....	28
3.2. Contrações isométricas da vesícula biliar de coelho e cobaia.....	28
3.2.1. Experimentos com a vesícula biliar de coelho.....	30
3.2.2. Experimentos com a vesícula biliar de cobaia.....	32
3.3. Dosagem de prostanóides.....	33
3.4. Avaliação simultânea da contração e concentração de Ca^{2+} intracelular.....	37

3.5. Apresentação dos resultados e análise estatística	41
3.6. Drogas, sais e soluções	42
4. RESULTADOS	45
4.1. Vesícula biliar isolada de coelho	45
4.2. Vesícula biliar isolada de cobaia	52
5. DISCUSSÃO	73
5.1. Efeitos da endotelina-1 e de outros agonistas na vesícula biliar isolada de coelho	73
5.2. Influência de antagonistas endotelinérgicos sobre contrações da vesícula biliar isolada de coelho induzidas por ET-1, ET-3 e SRTX	75
5.3. Importância dos prostanóides e do Ca ²⁺ intracelular nas contrações induzidas por endotelinas na vesícula biliar isolada de cobaia	83
5.4. Implicações fisiológicas ou fisiopatológicas	93
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

ABREVIACÕES

- [Ca²⁺]_i - concentração intracelular de cálcio livre
- AC – adenilil ciclase
- AMPC – monofosfato de adenosina cíclico
- AP-1/jun – fator de ativação
- BSA – albumina sérica bovina
- CCK – colecistocinina
- DAG – di-acil glicerol
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxiribonuclêico
- ECE - enzima conversora de endotelina
- EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
- EGTA – ácido etilenobis(oxietilenonitrilo)tetraacético
- ET - endotelina
- GC – guanilil ciclase
- HEPES – ácido [4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfônico
- INDO – indometacina
- IP₃ – inositol (1, 4, 5)-trifosfato
- LT – leucotrieno
- NF-1 – fator nuclear 1
- PBS – solução salina tamponada com fosfato
- PG – prostaglandina
- PKC – proteína quinase C
- RNA_m – ácido ribonuclêico mensageiro
- SRTX - sarafotoxina S6c
- TGF-β - fator beta de crescimento e transformação
- TX – tromboxana
- VB - vesícula biliar

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Estrutura das endotelinas-1, -2, -3 e da sarafotoxina S6c	8
Figura 2 – Esquema das vias de controle da produção de endotelina-1 ...	11
Figura 3 – Diagrama esquemático da metodologia empregada para estudo simultâneo da contração e alterações na concentração intracelular de Ca ²⁺ livre.....	39
Figura 4 –Registro isométrico típico dos efeitos contráteis induzidos pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de endotelina-1 na vesícula biliar isolada de coelho.....	46
Figura 5 – Curvas concentração-resposta médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, colecistocina (26-33), serotonina, carbacol e histamina na vesícula biliar isolada de coelho.....	47
Figura 6 - Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e IRL 1620 na vesícula biliar isolada de coelho.....	50
Figura 7 - Influência de antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos sobre a contração induzida pela endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c ou carbacol em tiras de vesícula biliar isolada de coelho.....	53

Figura 8 - Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos sobre os efeitos contráteis da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c em anéis de aorta torácica de coelho sem endotélio.....	54
Figura 9 - Influência da indometacina nas contrações induzidas pela endotelina-1, endotelina-3 e sarafotoxina S6c na vesícula biliar isolada de cobaia.....	55
Figura 10 - Influência da indometacina nas contrações da vesícula biliar isolada de cobaia induzidas pela endotelina-3 na ausência ou presença de BQ-123 ou BQ-788.....	57
Figura 11 - Influência da indometacina na contração da vesícula biliar isolada de cobaia induzida pela endotelina-3 (30 nM) na ausência ou presença de BQ-123 ou BQ-788.....	58
Figura 12 - Liberação de 6-ceto-PGF _{1α} induzida pela endotelina-1 (100 nM) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.....	60
Figura 13 - Influência da indometacina sobre a liberação de 6-ceto-PGF _{1α} basal ou induzida pela endotelina-1 (100 nM) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.	60
Figura 14 - Liberação de 6-ceto-PGF _{1α} induzida por adições cumulativas de concentrações crescentes de endotelina-1, endotelina-3 e sarafotoxina S6c em segmentos de vesícula biliar isolada de cobaia.	62

- Figura 15 - Liberação de TXB_2 induzida por adições cumulativas de concentrações crescentes de endotelina-1 em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.....63
- Figura 16 - Registro típico demonstrando contração e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular induzidos pela endotelina-1 em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.....67
- Figura 17 - Contração e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular induzidos pela endotelina-1 e sarafotoxina S6c em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.68
- Figura 18 - Influência da indometacina sobre a contração e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular induzido pela endotelina-1 em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.....69
- Figura 19 - Influência da indometacina sobre a contração e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular induzido pela sarafotoxina S6c em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.....70
- Figura 20 - Análise de regressão linear entre as alterações na contração e no aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular induzido pela endotelina-1 e sarafotoxina S6c, na ausência e na presença de indometacina (INDO; 5,6 μM), em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.....71
- Figura 21 - Influência da ionomicina e da associação de ionomicina mais EGTA sobre a contração e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+}

intracelular induzido pela endotelina-1 (100 nM) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia.	72
Figura 22 – Representação esquemática da proposta de que prostanóides gerados em resposta à ativação de receptores ET_A ou ET_B tem influências distintas sobre a musculatura lisa da VB de cobaia.....	92
Tabela 1 – Protocolo geral utilizado para determinação de eicosanóides por radioimunoensaio.	36
Tabela 2 – Reatividade de tiras de vesícula biliar isolada de coelho e de cobaia a diferentes agonistas.....	48
Tabela 3 - Respostas médias de tiras de vesícula biliar isolada de coelho e cobaia a agonistas de receptores endotelinérgicos.	51

RESUMO

O presente estudo procurou aprofundar os conhecimentos acerca das ações contráteis das endotelinas (ETs) na vesícula biliar (VB) de cobaia, comparando com seus perfis de ação na VB de outra espécie, o coelho, bem como avaliar a importância dos prostanóides e do Ca^{2+} intracelular nas contrações induzidas pelas ETs na VB de cobaia, por ativação de receptores ET_A e ET_B .

A ET-1 (0,1-100 nM) causou contrações tônicas gradativas da VB de coelho, com CK_{50} (i.e. a concentração que causa contração equivalente a 50% da resposta ao KCl 80 mM) de 3,4 nM e E_H (i.e efeito da maior concentração testada – 100 nM) de 186 ± 22 . Comparada com outros agonistas, a ET-1 foi 40 vezes menos potente do que o octapeptídeo C-terminal da colecistocinina (CCK-8), 103 e 23 vezes mais potente do que o carbacol e a serotonina, respectivamente, e equipotente à ET-3 e aos agonistas seletivos de receptores ET_B , sarafotoxina S6c (SRTX) e IRL 1620. A histamina foi inativa até a concentração de 3 μM . A reatividade da VB de coelho à ET-1 mostrou-se resistente a bloqueio por antagonistas seletivos de receptores ET_A (BQ-123 e A-127722-5) ou ET_B (BQ-788), em concentrações que inibiram, acentuadamente, respostas mediadas por estes receptores na

aorta isolada dessa mesma espécie. Esses resultados, comparados aos obtidos anteriormente na VB de cobaia sugerem um predomínio maior de receptores ET_B sobre os ET_A na VB de coelho do que na cobaia.

Considerando que a VB de cobaia também expressa ambos os receptores ET_A e ET_B , parte do presente estudo procurou avaliar qual o grau de acoplamento de cada um desses receptores a mecanismos contráteis dependentes de prostanóide nesta preparação. A incubação prévia do tecido com indometacina (INDO; 5,6 μ M), um inibidor não-seletivo de ciclooxigenases, causou inibição maior das respostas da VB à SRTX, do que à ET-3 e ET-1. Respostas da VB de cobaia induzidas pela ET-3 na presença de BQ-123 (i.e. quando os recéptores ET_A estavam bloqueados) foram praticamente abolidas pela presença simultânea de INDO. Ao contrário, a INDO potencializou acentuadamente as contrações induzidas pela ET-3 através dos receptores ET_A (i.e. quando os receptores ET_B estavam bloqueados com o BQ-788). Os resultados sugerem que os receptores ET_B parecem estar acoplados à geração de eicosanóides contráteis, enquanto os receptores ET_A provavelmente sinalizam a produção de eicosanóides que limitam a magnitude da contração da VB de cobaia.

Finalmente, investigamos a possível importância de prostanóides sobre as contrações e alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) induzidas pela ET-1 e a SRTX na VB de cobaia. Ambos os

agonistas aumentaram a liberação de 6-ceto-PGF_{1α}, o metabólito estável da prostaciclina, e esse efeito foi bloqueado pela INDO. Além disso, a ET-1 e a SRTX (1, 10 e 100 nM) induziram alterações gradativas simultâneas na tensão e na [Ca²⁺]_i (pela técnica do Fura-2). A INDO (5,6 μ M) reduziu apenas a contração causada pela maior concentração de ET-1, no entanto, diminuiu acentuadamente as alterações de tensão e de intensidade da fluorescência induzidas pela SRTX. Estes resultados demonstram que ambos os efeitos de cada um dos agonistas estão fortemente correlacionados. A influência diferenciada da INDO sobre as respostas induzidas pela estimulação simultânea de receptores ET_A e ET_B (com ET-1) ou somente de receptores ET_B (com SRTX), sugere fortemente que cada subtipo de receptor está acoplado a mecanismos de transdução de sinal que dependem da geração de conjuntos distintos de prostanóides.

ABSTRACT

The current study attempted to further enhance our knowledge about the contractile effects of endothelins (ETs) in strips of guinea pig gallbladder (GB), comparing them with those of rabbit GB, as well to evaluate the importance of prostanoids and intracellular Ca^{2+} on contractions induced by ET-1 stimulation of ET_A and ET_B receptors in guinea pig GB.

ET-1 (0.1-100.0 nM) caused graded tonic contractions with a CK_{50} (concentration causing response equivalent to 50% of KCl 80 mM) of 3.4 nM and E_H (response to highest concentration) of 186 ± 22 , being 40-fold less potent than cholecystokinin-8 (CCK-8), 103 and 23-fold more potent than carbachol and serotonin, respectively, but equipotent to ET-3, sarafotoxin S6c (SRTX) and IRL 1620. Histamine was inactive up to 3 μM . Selective antagonists for ET_A (BQ-123 and A-127722-5) or ET_B receptors (BQ-788) did not affect responses of rabbit GB to ET-1, at concentrations which markedly inhibited responses triggered by these receptors in the rabbit aorta. These results would suggest that the rabbit GB displays a greater proportion of functional ET_B receptors over ET_A receptors than that described in the guinea pig GB.

Considering that guinea pig GB expresses both ET receptor types, part of the present study was to assess to what extent ET_A and ET_B receptors are each coupled to eicosanoid-dependent contractile mechanisms in this tissue. Indomethacin (INDO; 5.6 μ M), a non selective cyclo-oxygenase inhibitor, effectively inhibited contractile responses of the guinea pig GB to ET-1, and even more so those to ET-3 and SRTX. In another set of experiments we evaluated if INDO could differentially affect ET_A and ET_B receptor-mediated responses to ET-3, in presence of BQ-788 or BQ-123, respectively. In presence of ET_A receptor blockade with BQ-123, INDO almost abolished responsiveness to ET-3. In sharp contrast, when ET_B receptors were blocked with BQ-788, contractions induced by ET-3 were significantly potentiated in presence of INDO. Whereas ET_B receptors seem to be coupled to generation of contractile prostanoids, ET_A receptors probably can signal the production of prostanoids which limit the magnitude of guinea pig GB contraction.

Finally, we also assessed the relationships between prostanoid synthesis, contraction and changes in intracellular Ca²⁺ induced by ET-1 and SRTX, in this tissue. Both agonists enhanced gallbladder prostacyclin release (6-keto-PGF_{1 α} levels, in ng/ml), in INDO-sensitive fashion. They also induced simultaneous concentration-dependent changes in tension and intracellular Ca²⁺ (fura-2 technique), at 1, 10 and 100 nM. INDO (5.6 μ M) only reduced the contraction triggered by the

highest concentration of ET-1, but markedly depressed the changes in both tension and Ca^{2+} fluorescence intensity induced by SRTX. These latter results indicate that both effects of each agonists are closely related. Moreover, taken together with the previous data, we suggest that the differential influence of INDO, on responses triggered either by simultaneous ET_A and ET_B receptors (with ET-1) or solely ET_B receptors (with SRTX), indicate that each receptor type is coupled to signaling mechanisms which trigger distinct patterns of prostanoid generation.

PUBLICAÇÕES

Trabalhos relacionados à tese que foram publicados ou submetidos à publicação durante o doutorado:

1. **CARDOZO, A.M.**; KOEPP, J.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; RAE, G.A.
Receptors mediating endothelin-1-induced contractions of rabbit gallbladder. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **36 (suppl. 1)**: S264-S266, 2000.
2. NORA, H.C.; **CARDOZO, A.M.**; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; RAE, G.A. Influences of indomethacin on contractions induced by endothelins in guinea pig isolated gallbladder. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **36 (suppl. 1)**: S267-S269, 2000.
3. KOEPP, J.; **CARDOZO, A.M.**; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; RAE, G.A. Influence of indomethacin on effects of endothelin-1 on guinea pig isolated rings of common bile duct and sphincter of Oddi. *European Journal of Pharmacology*, **435**: 103-111, 2002.
4. **CARDOZO, A.M.**; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; BKAILY, G.; RAE, G.A. Roles of prostanoids and intracellular calcium on endothelin-1-induced contractions of guinea pig isolated gallbladder. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, submetido à publicação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. - Papel da vesícula biliar

A vesícula biliar (VB) é um órgão pequeno em formato de pêra, com volume que varia entre 35 e 50 ml, quando em repouso. Ela está localizada abaixo do fígado, no lado direito do abdômen e conecta-se ao fígado e ao intestino delgado através de ductos biliares, que podem ser intra- ou extra-hepáticos. Os ductos intra-hepáticos, que incluem os canalículos biliares que desembocam nos dúctulos biliares (ou canais de Hering), são responsáveis pela coleta da bile secretada pelos hepatócitos e sua condução até o ducto hepático, cuja localização já é extra-hepática. Além do ducto hepático, que emerge do fígado, há mais dois ductos extra-hepáticos: o ducto cístico, proveniente da VB, e o ducto biliar comum, que inicia na junção dos ductos hepático e cístico e termina no esfíncter de Oddi (junção colédoco-duodenal), desembocando no intestino delgado ao nível do duodeno (Snell, 1985). A VB tem função de concentrar e armazenar a bile, enquanto que a dos ductos extra-hepáticos é de conduzir a bile até o duodeno. Coletivamente, a VB, os ductos biliares intra- e extra-hepáticos e o esfíncter de Oddi constituem o chamado trato biliar. A VB concentra a bile removendo água através de sua parede, sendo o volume de água removido prontamente substituído pela entrada de mais bile. Assim, a bile é um líquido marrom amarelado que é constituída por água, colesterol, lipídios e bilirrubina, além de sais biliares responsáveis pela emulsificação de gorduras (Moraes, 1987). O direcionamento da bile para ser armazenada e/ou concentrada

na VB ocorre somente quando a pressão no ducto biliar comum é maior do que no ducto cístico (para revisão ver Shaffer, 2000).

Após a ingestão de alimento, células endócrinas localizadas na mucosa do duodeno e jejuno liberam colecistocinina (CCK), em resposta a concentrações intestinais elevadas de ácidos graxos e monoglicerídeos, ambos produtos do metabolismo de gorduras (Thompson *et al.*, 1975). Este hormônio induz simultaneamente contração da VB e relaxamento do esfínter de Oddi, possibilitando que a bile que estava armazenada no trato biliar seja despejada no duodeno (Behar e Biancani, 1980). As principais funções fisiológicas da bile são a de auxiliar a digestão de gorduras ingeridas, por atuação dos sais biliares, e auxiliar na absorção de vitaminas lipossolúveis, pelo seu alto teor de colesterol. Em condições normais, a maior parte da bile é reabsorvida no intestino e retorna para o fígado através da circulação entero-hepática. É importante ressaltar que este processo, por ser cíclico, possibilita a síntese amplificada de bile, que é essencial à digestão da refeição (para revisão ver Hofmann *et al.*, 1999).

Distúrbios da VB, relacionados à presença de cálculos biliares e outras formas de obstrução biliar, são um problema comum, atingindo cerca de 10-12 % da população dos Estados Unidos e Grã-Bretanha (cerca de 20 milhões de americanos e 5,5 milhões de britânicos), com incidência maior em mulheres, em associação com múltiplas gestações, obesidade e perda rápida de peso, bem como em pacientes idosos (Dani e Castro, 1993; Beckingham, 2001). Nestes países, mais de 500.000 e 50.000 colecistectomias são realizadas anualmente,

respectivamente, tornando este procedimento cirúrgico bastante comum. Neste sentido, segundo o National Institutes of Health americano, os custos associados a desordens biliares são maiores do que aqueles associados a qualquer outro distúrbio gastrointestinal, incluindo úlceras gastro-duodenais ou câncer colorretal (Mawe, 1998).

Evidências consideráveis sugerem que irregularidades na motilidade da VB desempenham um papel crucial na maioria das patologias biliares. Neste sentido, estudos pré-clínicos e clínicos, demonstram que o esvaziamento inadequado da VB é um fator primordial na patogênese dos cálculos biliares. Pacientes recebendo nutrição exclusivamente parenteral por um período longo de tempo apresentam incidência alta de formação de cálculos, confirmando a importância da motilidade na patogenia desse distúrbio (Pitt *et al.*, 1983). Distúrbios no esvaziamento do conteúdo da VB também podem estar associados a outras afecções que independem da presença de cálculos, como colecistite aguda ou crônica.

A motilidade da VB é controlada por mecanismos neurais e endócrinos. O controle neural da VB é mediado por um plexo intramural que recebe projeções do nervo vago (parassimpático; Clave e Gaspar, 1969), do sistema nervoso simpático e do plexo intramural do esfíncter de Oddi (para revisão ver Kennedy *et al.*, 2000). Está bem estabelecido que a atividade vagal contribui para a manutenção do tônus da VB, porém a função da inervação simpática é controversa. A administração de adrenalina, noradrenalina ou isoproterenol em

doses fisiológicas não causa nenhum efeito neste órgão (Schoetz *et al.*, 1978). No entanto, paradoxalmente, drogas adrenérgicas causam relaxamento da VB após tratamento com CCK (Strah *et al.*, 1986), mediado por β -adrenoceptores, enquanto a estimulação dos α -adrenoceptores induz contração de tiras de VB isolada de coelho (Amer, 1972). O plexo ganglionar intramural contém neurônios colinérgicos, mas apresenta também projeções de neurônios catecolaminérgicos, serotoninérgicos e peptidérgicos (Bauer *et al.*, 1991). Entre os peptídeos neuronais identificados podemos citar a CCK (Strah *et al.*, 1986), peptídeo intestinal vasoativo (Strah *et al.*, 1986), peptídeo liberador de gastrina (Schjoldager *et al.*, 1991) e neuropeptídeo Y (Allen *et al.*, 1984) (para revisão ver Shaffer, 2000). Muitos desses neurônios peptidérgicos parecem exercer funções pró-cinéticas na motilidade da VB, mas os que contém polipeptídeo intestinal vasoativo, somatostatina e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina são considerados inibidores da motilidade da VB (para revisão ver Lonovics *et al.*, 1998).

Em vista da complexidade do controle da motilidade da VB, avanços na sua compreensão, ainda que discretos, são fundamentais na tentativa de compreender os intrincados mecanismos responsáveis pelos distúrbios que acometem este órgão, bem como em definir estratégias terapêuticas alternativas à colecistectomia. Além dos riscos inerentes à intervenção cirúrgica, levantamentos estatísticos relatam que 10 a 20% dos pacientes colecistectomizados ainda sofrem de dor, que se assemelha à cólica biliar pré-

operatória (Singh *et al.*, 1996) e pode ser causada, por exemplo, por disfunção do esfíncter de Oddi (para revisão ver Lehman e Sherman, 1996). Além disso, a remoção da VB e, conseqüentemente, do principal mecanismo concentrador da bile, pode acarretar distúrbios na digestão e absorção de gorduras em determinados pacientes, algumas vezes caracterizados por esteatorréia.

A importância fisiológica da CCK como indutor de esvaziamento da VB está bem estabelecida (para revisão, ver Lonovics, 1998). A sua ação neste órgão se deve em parte a um efeito direto nas células musculares lisas da VB, bem como pela ativação de mecanismos neurais envolvendo a estimulação de neurônios colinérgicos pré-ganglionares (Grider *et al.*, 1994). Porém, Moumami e colaboradores (1992) verificaram que a endotelina-1 (ET-1), um peptídeo formado por 21 aminoácidos, é quase tão potente quanto a CCK-8 (um fragmento ativo da CCK) em induzir contração tônica em tiras de VB isolada de cobaia. Considerando que a ET-1 é sintetizada tanto por diferentes células hepáticas (para revisão ver Mallat e Lotersztajn, 1996), bem como por células epiteliais do trato biliar (Housset *et al.*, 1993a), investigações acerca das suas ações motoras sobre os diversos componentes do trato biliar, e em especial sobre a VB, parecem-nos bastante pertinentes.

1.2. - As endotelinas, vias de biosíntese, seus receptores e mecanismos de sinalização celular

A existência de um potente peptídeo vasoconstritor produzido pelas células endoteliais vasculares foi sugerida por dois diferentes grupos de pesquisadores, Hickey e colaboradores em 1985 e O'Brien e colaboradores em 1987. Um desses peptídeos foi purificado do sobrenadante de cultura de células endoteliais de aorta de porco e clonado por Yanagisawa *et al.* (1988), que o denominaram de ET. A análise do DNA humano revelou que a ET pertence, na verdade, a uma família de isopeptídeos codificada por três genes diferentes: ET-1 (a ET descoberta por Yanagisawa *et al.*, 1988), ET-2 e ET-3 (Inoue *et al.*, 1989a). Um quarto isopeptídeo, denominado "peptídeo intestinal vasoconstritor" (VIC) ou ET- β (Saida *et al.*, 1989), acabou revelando-se como a variante da ET-2 encontrada no intestino de camundongos e ratos (Bloch *et al.*, 1991). A expressão das três ETs ocorre de modo bastante diversificado em diferentes tecidos, podendo induzir múltiplos efeitos em diferentes sistemas fisiológicos (para revisões ver Rae *et al.*, 1995; Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

As ETs apresentam grande homologia estrutural (60-70%) com as sarafotoxinas (SRTX) S6a, S6b, S6c e S6d, peptídeos isolados do veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (para revisão ver Sokolovsky, 1992). Todos os membros da superfamília das ETs e SRTXs, à exceção da ET-1(1-31) e ET-1(1-32) (ver abaixo), caracterizam-se por possuir 21 resíduos de aminoácidos e duas pontes de dissulfeto unindo pares de resíduos de cisteína

(Cis¹-Cis¹⁵ e Cis³-Cis¹¹) (Sokolovsky, 1992; Kochva *et al.*, 1993) (Figura 1). A estrutura em anel e os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos no segmento linear carbóxi terminal são indispensáveis à sua atividade biológica (Kimura *et al.*, 1988).

O principal local de síntese de ET-1, em termos de expressão de RNAm para a pré-pró-ET-1 e presença de enzima conversora de ET intracelular, são as células endoteliais (Inoue *et al.*, 1989a,b; Webb *et al.*, 1998). As células musculares lisas vasculares também sintetizam ET-1. Porém, pelo menos em aorta humana, a produção deste peptídeo é aproximadamente 100 vezes menor do que em células endoteliais. Além dessas, outras células (epiteliais, macrófagos, fibroblastos, neurônios, entre outras) expressam o RNAm para ET-1 em diversos órgãos e tecidos como coração, pulmão, rins, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado e sistema nervoso central. Quantidades limitadas de ET-2 são sintetizadas pelo endotélio e por células cardíacas e renais. A ET-3 parece ser seletivamente expressa no sistema endócrino, trato gastrointestinal e sistema nervoso central. Esta distribuição tecidual ampla, mas diversificada, das ETs sugere que elas possam participar independentemente de mecanismos regulatórios complexos em vários órgãos e sistemas (para revisão ver Webb, 1997; Masaki *et al.*, 1999).

A biosíntese das ETs, a exemplo de outros hormônios ou neurotransmissores peptídicos, ocorre através de proteólise de pré-pró-peptídeos específicos. Assim, a síntese de cada membro da família das ETs é

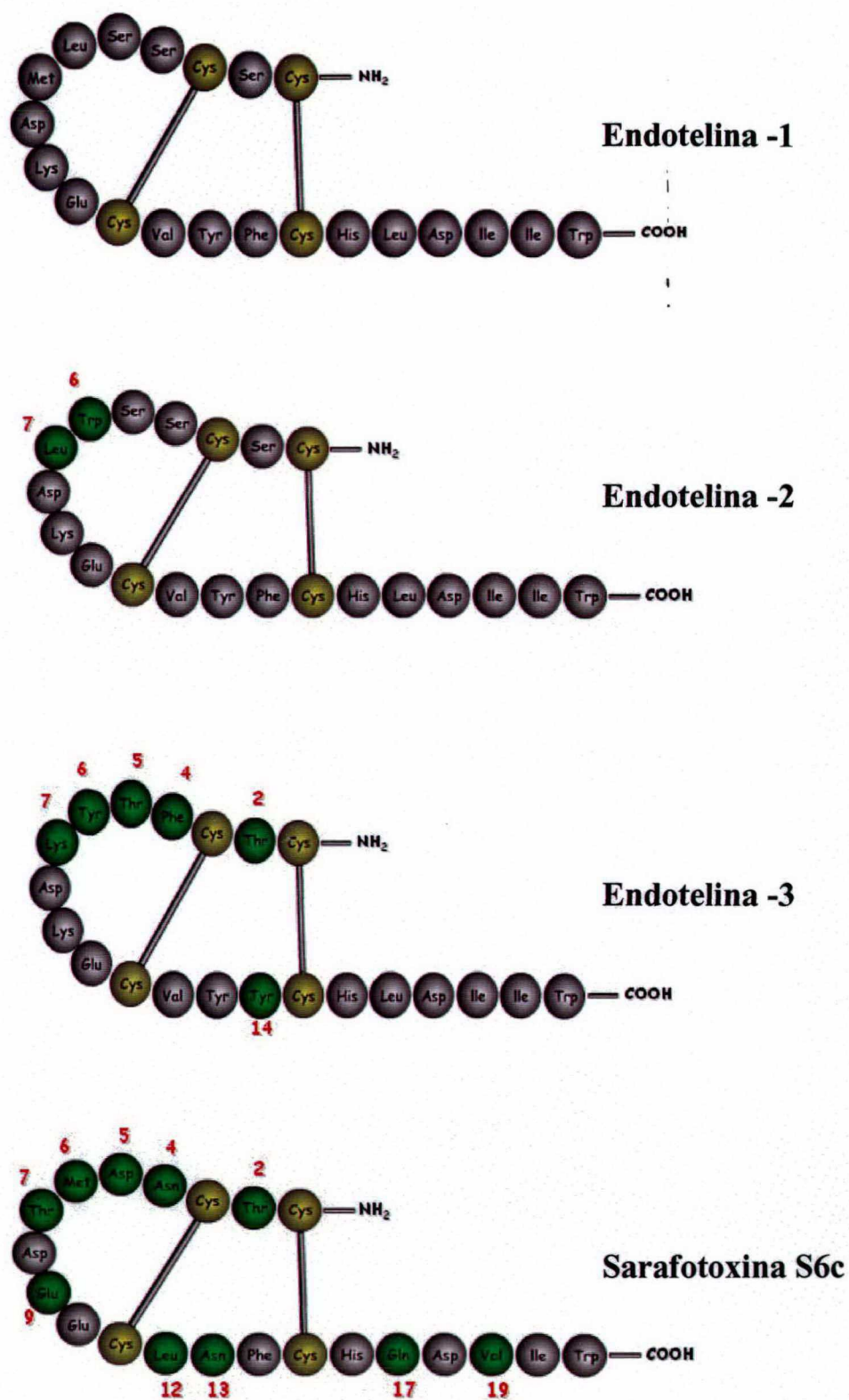


Figura 1 – Estruturas das endotelinas-1,-2,-3 e sarafotoxina S6c.

codificada por um gene distinto que dá origem à pré-pró-ET específica para a isoforma madura (Inoue *et al.*, 1989a). No genoma humano, os genes que codificam as pré-pró-ET-1, 2 e 3 estão localizados no cromossomos 6, 1 e 20, respectivamente (Bloch *et al.*, 1989a,b; 1991). O gene da pré-pró-ET-1 é formado por 5 *exons*, separados por 4 *introns*, além de duas regiões flangeadoras. Cada um dos 5 *exons* é responsável pela decodificação de uma porção da pré-pró-ET-1. Nas células endoteliais, o local de início da transcrição foi mapeado na posição do gene situada a 98 e 31 pares de base (pb) após os elementos CAAT e TATA *box*, respectivamente (Inoue *et al.*, 1989b). As regiões promotoras dos genes das pré-pró-ETs demonstraram a presença, na extremidade 5', de elementos regulatórios de transcrição com afinidade para AP-1/Jun e NF-1, que medeiam a formação do RNAm em células endoteliais expostas a angiotensina II ou forbol éster e ao fator- β de crescimento e transformação (TGF- β), respectivamente (para revisão ver Miyauchi e Masaki, 1999). Também, na região flangeadora 3' do gene, existem seqüências ricas em adenina-uracila, que desestabilizam seletivamente o RNAm da pré-pró-ET-1, responsável por sua meia-vida biológica relativamente curta de 15 min. Outros sítios, como as quatro cópias do hexanucleotídeo CTGGGA e o elemento regulatório de reação de fase aguda, também servem como mecanismos potenciais para a regulação da produção de ET-1 (Miyauchi e Goto, 1999).

Vários fatores extracelulares podem influenciar, tanto positivamente como negativamente, a produção de ET-1, através de estímulos químicos ou

mecânicos (Figura 2). Níveis aumentados de RNAm foram observados após o tratamento de células endoteliais cultivadas com fatores de crescimento e citocinas, tais como trombina, TGF- β , fator α de necrose tumoral, interleucina-1 e insulina, ou ainda com substâncias vasoativas como a noradrenalina, angiotensina II, arginina-vasopressina, bradicinina e a própria ET-1. Além desses, a hipóxia, ésteres de forbol que ativam a proteína quinase C (PKC) e os ionóforos de Ca^{2+} (A23187 e ionomicina) também causam aumento da produção de ET-1 (para revisão ver Miyauchi e Masaki, 1999). Fatores como a trombina, insulina, angiotensina II, arginina-vasopressina participam na regulação da expressão por estimularem a fosfolipase C (Schiffrin e Touyz, 1998), com ativação da PKC e conseqüente indução da síntese da proteína c-Jun, que é o principal ligante do fator de transcrição AP-1 (Tasaka e Kitazumi, 1994).

Por outro lado, a síntese de ET-1 pode ser inibida por óxido nítrico, drogas doadoras de óxido nítrico, prostanóides dilatadores, peptídeo natriurético atrial e lipopolissacarídeo, através de ações que envolvem produção de GMPc ou AMPc (Gray e Webb, 1996). A heparina também diminui a expressão de ET-1 através da inibição da PKC (Imai *et al.*, 1993), embora esse composto também atue como antagonista do receptor para IP_3 (Ghosh *et al.*, 1988). Essas características do gene da ET-1 são muito semelhantes àquelas dos chamados genes de resposta imediata.

Há fatores, como o estresse de cisalhamento, que afetam a transcrição do gene da pré-pró-ET-1 de modo ambivalente. Tem sido verificado que o baixo

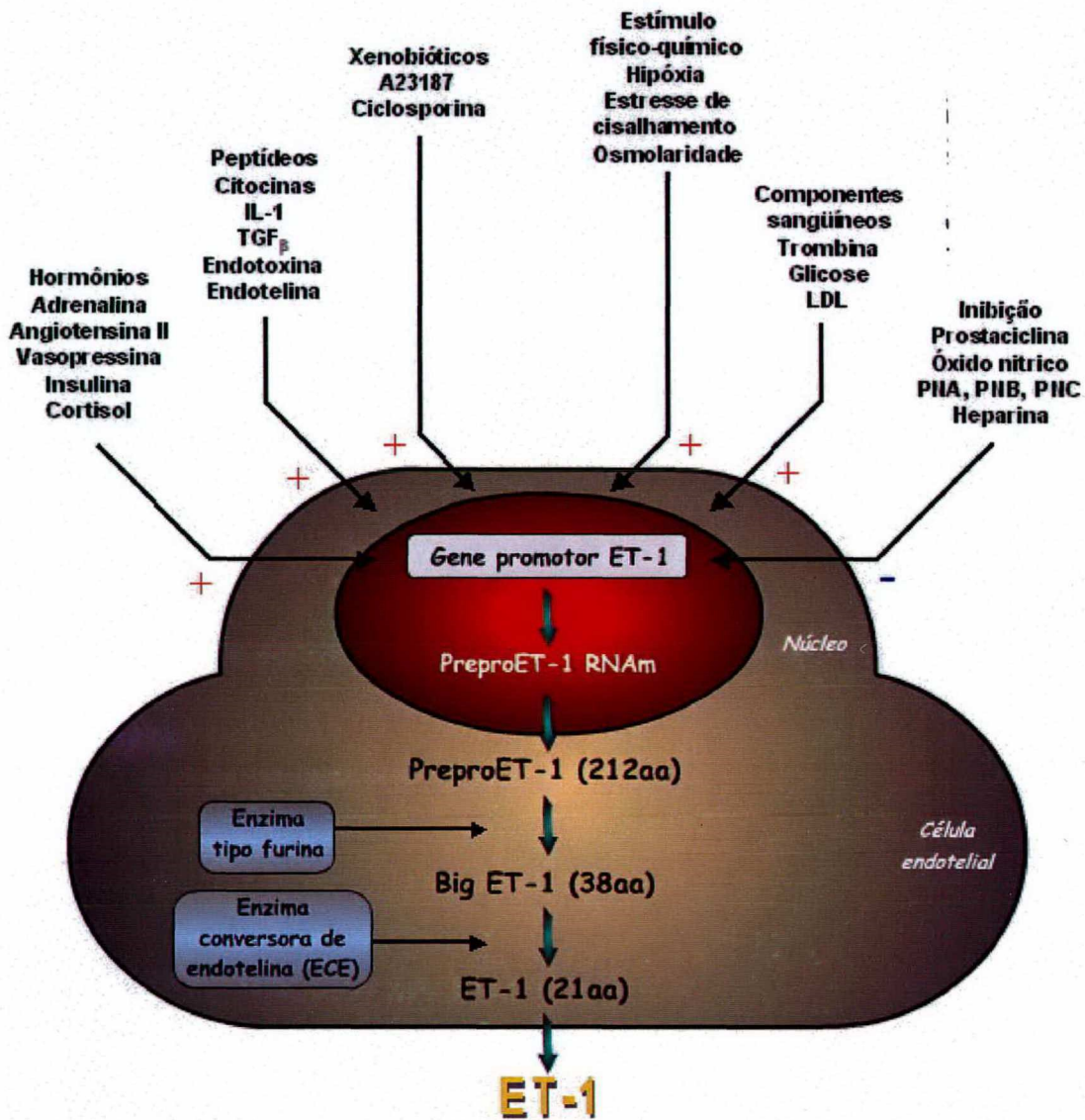


Figura 2 – Esquema das vias de controle da produção de endotelina-1. IL-1, interleucina-1; TGF β , fator β de crescimento e transformação; LDL, lipoproteína de baixa intensidade; PNA, peptídeo natriurético atrial; PNB, peptídeo natriurético cerebral; PNC, peptídeo natriurético do tipo C. aa, aminoácidos. Adaptado de Haynes e Weeb (1998).

(< 2 dina/cm²) e o alto estresse (> 6 dina/cm²) causam, respectivamente, aumento e diminuição da síntese de ET-1. Embora o mecanismo pelo qual o estresse de cisalhamento regula a expressão do RNAm não seja conhecido por completo, sabe-se que não é dependente de PKC ou AMPc (Malek *et al.*, 1993), mas depende de mudanças na rede celular de microfilamentos (Malek *et al.*, 1997).

Uma vez formada, a pré-pró-ET (constituída aproximadamente de 210 aminoácidos) é clivada em dois pontos pela convertase furina (Denault *et al.*, 1995), originando um intermediário inativo chamado, genericamente, de big-ET. Por sua vez, cada big-ET (formada de 37 a 41 aminoácidos, dependendo da isoforma) é então transformada no peptídeo ativo correspondente por ação de uma endopeptidase di-básica específica denominada enzima conversora de ET (ECE; para revisão ver Battistini *et al.*, 1993). Este último processo pode ocorrer tanto no meio intracelular quanto no espaço extracelular (Harrison *et al.*, 1995).

Duas ECEs distintas já foram clonadas e denominadas de ECE-1 (Xu *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994) e ECE-2 (Emoto e Yanagisawa, 1995). Ambas são metalopeptidases sensíveis ao bloqueio pelo fosforamidom e exibem cerca de 59% de homologia estrutural, com um domínio citoplasmático amina-terminal curto, um único segmento transmembrana, e uma porção extramembranar carbóxi-terminal longa, na qual está inserido o sítio ativo das enzimas (Nussdorfer *et al.*, 1999). A ECE-1 apresenta atividade ótima em pH neutro e parece funcionar tanto na via secretória quanto na superfície celular

(para revisão ver Turner *et al.*, 1998). A ECE-1 é codificada por um único gene, mas pode apresentar-se em pelo menos quatro isoformas distintas, dependendo de qual promotor é ativado: a ECE-1a (ou ECE-1 β), ECE-1b (ou ECE-1 α), ECE-1c e ECE-1d (Shimada *et al.*, 1994, 1995; Valdenaire *et al.*, 1999). As várias isoformas de ECE-1 apresentam cerca de 90% de homologia estrutural, mas as diferenças encontradas nas seqüências próximas à amina terminal parecem ser cruciais à alocação da enzima ao complexo de Golgi ou à membrana celular (Barnes *et al.*, 1998). A distribuição da ECE-1 é ubíqua, mas especialmente marcante no endotélio, pulmões, ovários, testículos e medula das adrenais. Por outro lado, a ECE-2 é codificada por um gene distinto da ECE-1, apresenta atividade ótima em pH ácido (5.5) e parece estar localizada apenas na rede trans-Golgi. Além disso, é 250 vezes mais sensível ao bloqueio pelo fosforamidom do que as isoformas da ECE-1 e pode apresentar-se em pelo menos duas isoformas: a ECE-2a e a ECE-2b (Nakahara *et al.*, 1999). O cérebro adulto é o órgão que mais expressa o RNAm para a ECE-2, seguido pelas glândulas adrenais, ovário e útero. As isoformas da ECE-1 e da ECE-2 são relativamente seletivas para big-ET-1, sendo muito menos ativas ou até inativas na clivagem da big-ET-2 e big-ET-3. Por isso, não se pode descartar a possibilidade da existência de outras ECEs (para revisão ver Opgenorth *et al.*, 1995), mais eficientes, por exemplo, na clivagem da big-ET-2 e/ou big-ET-3.

Nesse sentido, foi constatado que o ducto deferente de rato e a íris de bovino apresentam uma ECE que converte big-ET-3 (Mattera *et al.*, 1993;

Hasegawa *et al.*, 1998). Além disso, membranas pulmonares de rato contêm uma ECE sensível ao bloqueio por pepstatina (Chiou *et al.*, 1994) e a circulação pulmonar de cobaia parece conter uma ECE distinta que converte big-ET-1, mas não big-ET-2, enquanto a sistêmica converte ambas (Gratton *et al.*, 1995). Além disso, o fato de terem sido encontradas quantidades significantes de ET-1/ET-2 em camundongos que tiveram os genes que expressam a ECE-1 e ECE-2 deletados sugere que proteases distintas da ECE-1 e ECE-2 possam estar envolvidas na síntese de ET-1 *in vivo* (Yanagisawa *et al.*, 2000).

É importante salientar que, embora a via da biosíntese das ETs envolvendo as ECEs seja a principal e a mais investigada, há evidências de que a big-ET-1 possa ser clivada por uma quimase produzida por mastócitos ou pela metaloproteinase de matriz 2, originando a ET-1(1-31) e a ET-1(1-32), respectivamente, ambas consideradas novos membros endógenos da família das endotelinas (Wypij *et al.*, 1992; Fernandes-Patron, 1999). É possível que isoformas análogas destas últimas, formadas a partir da pré-pró-ET-2 e pré-pró-ET-3, também constituam membros fisiologicamente relevantes da família das ETs (Takai *et al.*, 1998).

As concentrações de ETs imunorreativas circulantes no plasma venoso de humanos saudáveis variam entre 1 e 10 pM, compreendendo 60% de big-ET-1, 30% de ET-1 e 10% de ET-3 (Suzuki *et al.*, 1989; Miyauchi *et al.*, 1991). A ET-2 não foi detectada no plasma humano. Convém ressaltar que as concentrações de ET-1 circulante encontradas são bem menores do que as

concentrações necessárias para induzir, por exemplo, vasoconstrição, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta discrepância tem sido explicada através de estudos demonstrando que as concentrações de ET-1 são mais elevadas na interface do endotélio com o músculo liso vascular. Yoshimoto e colaboradores (1991) verificaram que as células endoteliais secretam substancialmente mais ET-1 na direção abluminal do que para o lúmen. Esses achados também reforçam a teoria de que a ET-1 atua essencialmente de modo autócrino e/ou parácrino, como um hormônio de ação local.

A ET-1 é rapidamente removida da circulação após injeção intravenosa em *bolus*, com meia-vida biológica de aproximadamente 1 minuto, embora o seu efeito pressor persista por até 1 hora (Sirviö *et al.*, 1990; Vierhapper *et al.*, 1990). A depuração plasmática de ET-1 ocorre principalmente nos pulmões (80-90%), durante a primeira passagem (De Nucci *et al.*, 1988), com os rins desempenhando um papel secundário (Kohnno *et al.*, 1989). Nesse sentido, parece que receptores endotelinérgicos do endotélio vascular (do tipo ET_B, ver abaixo) desempenham papel destacado na remoção da ET-1 circulante, atuando como verdadeiros receptores de “*clearance*”, já que a administração de antagonistas desse receptor prolongam a meia vida da ET-1 sem afetar a da big-ET-1 (Fukuroda *et al.*, 1994; Plumpton *et al.*, 1996; Löffler *et al.*, 1993). Além disso, as ETs podem também sofrer degradação enzimática por endopeptidases, mais especificamente, pela endopeptidase neutra (E.C.3.4.24.11) (Abassi *et al.*, 1993).

Apesar da estreita homologia estrutural entre as ETs, as atividades biológicas das três isoformas apresentam diferenças consideráveis quanto à natureza das respostas que desencadeiam em diversos tecidos, inclusive num mesmo tecido (para revisão ver Kochva *et al.*, 1993; Bax e Saxena, 1994). Essa diversidade de efeitos pode ser atribuída à diversidade de receptores ou à ativação de diferentes vias de transdução, ou ainda, à ação combinada destes dois mecanismos (para revisão ver Goto *et al.*, 1996). Mamíferos parecem expressar apenas dois receptores endotelinérgicos, denominados de ET_A e ET_B, os quais são codificados por genes distintos e estão estruturados em 8 e 7 exons e mapeados aos cromossomos 4 e 13, respectivamente. As semelhanças consideráveis na organização estrutural destes genes sugerem uma origem ancestral comum (Elshourbagy *et al.*, 1996). A regulação da síntese de ambos os receptores pode ser influenciada por vários fatores, sendo estimulada por ciclosporina e isquemia (Nambi *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1990), ou inibida por ET-1, angiotensina II e forbol éster (Hirata *et al.*, 1988a; Roubert *et al.*, 1989). Os receptores ET_A e ET_B apresentam perfis farmacológicos claramente diferentes. O receptor ET_A caracteriza-se por sua altíssima afinidade, na ordem subnanomolar, pela ET-1 e ET-2 e baixa afinidade pela ET-3 (Arai *et al.*, 1990), cerca de 70 a 100 vezes menor quando comparada à ET-1. Embora não se conheça agonistas seletivos do receptor ET_A, foram sintetizados vários antagonistas seletivos peptídicos e não peptídicos para esse receptor, tais como BQ-123, BQ-610, FR 139317 (todos peptídicos) e o A-127722-5 (não-

peptídico), entre outros (para revisão ver Webb e Meek, 1997). Por sua vez, o receptor ET_B , que não discrimina entre as três ETs endógenas (Sakurai *et al.*, 1990), é ativado seletivamente pela SRTX S6c, IRL 1620 e BQ-3020, entre outros, e bloqueado seletivamente pelo BQ-788, IRL2500 (ambos peptídicos) (para revisão ver Masaki *et al.*, 1994; Webb e Meek, 1997).

Anfíbios apresentam, ainda, um subtipo distinto de receptor ET_A , designado receptor ET_{AX} (Kumar *et al.*, 1993), e um terceiro tipo de receptor, o receptor ET_C , que apresenta maior afinidade pela ET-3 do que pela ET-1 ou ET-2 e foi clonado a partir de melanóforos (Karne *et al.*, 1993). As evidências para a existência do receptor ET_C em mamíferos são apenas funcionais (Emori *et al.*, 1990; Douglas *et al.*, 1995). Além disso, subtipos de receptores ET_A e ET_B (provisoriamente denominados ET_{A1} , ET_{A2} e ET_{B1} , ET_{B2}) ou receptores endotelinérgicos atípicos também foram propostos com base em ações distintas de agonistas e antagonistas em alguns efeitos mediados através de receptores ET_A e ET_B (para revisão ver Bax e Saxena, 1994). Possivelmente, tais variantes, se é que elas efetivamente ocorrem, são consequência de processamentos alternativos dos RNAm que codificam a síntese de cada receptor (Elshourbagy *et al.*, 1996; Miyamoto *et al.*, 1996).

Os receptores endotelinérgicos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, formados por sete domínios transmembrana, uma porção amina-terminal extracelular e um domínio carbóxi-terminal citoplasmático. Ambos os receptores apresentam grande homologia nos sete

domínios transmembrana, porém diferem não somente na terminação amina, mas também no segmento carbóxi, que é crucial ao seu acoplamento com proteínas G e por seus efeitos celulares diversificados.

A ativação de receptores ET_A e ET_B possibilita o acoplamento de, no mínimo, três classes de proteína $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$ e $G\alpha_q$; Levin, 1996; Miyauchi e Masaki, 1999). A capacidade de interação de diferentes porções do receptor com diferentes proteínas $G\alpha$ está associada à ativação de uma complexa rede de vias de transdução de sinal, mediada por diferentes mensageiros (Okamoto *et al.*, 1997; Doi *et al.*, 1999). Assim, o acoplamento de $G\alpha_s$ resulta na ativação da adenilato ciclase (AC); a ativação de $G\alpha_i$ induz a inibição da AC e provavelmente a ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O acoplamento de $G\alpha_q$ está relacionado com a ativação da fosfolipase C e de canais catiônicos não seletivos. Outros possíveis mecanismos de transdução ativados pela estimulação dos receptores endotelinérgicos são ativação da fosfolipase A_2 e D, guanilato ciclase (GC), transportador Na^+/H^+ , proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e indiretamente via liberação de outras substâncias (para revisão ver Douglas e Ohlstein, 1997).

A estimulação da fosfolipase C, mediada pela ativação de receptores ET_A e ET_B , é uma via de transdução bastante comum em vários tecidos que acarreta a hidrólise de fosfatidilinositóis, com formação rápida de inositol trifosfato (IP_3) e acúmulo de diacilglicerol (DAG). O IP_3 ativa receptores específicos localizados no retículo endoplasmático, induzindo a liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) destes

depósitos intracelulares (Hirata *et al.*, 1988b), com conseqüente elevação transitória da concentração citosólica de Ca^{2+} . No entanto, esse aumento é seguido de um acréscimo sustentado da concentração do íon, resultante do influxo de Ca^{2+} a partir do meio extracelular (Simonson *et al.*, 1990). Embora o mecanismo preciso envolvido neste influxo não tenha sido elucidado, sugere-se que seja através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e/ou de canais catiônicos não seletivos operados por receptores. Especula-se ainda que a abertura dos canais de cátions possa ser mediada diretamente por proteína G ativada pelas ETs ou, alternativamente, via formação de IP_4 , através da estimulação dos receptores endotelinérgicos. Dessa maneira, o aumento intracelular de Ca^{2+} estimula a calmodulina, que em células musculares lisas causa contração e em células endoteliais ativa a óxido nítrico sintase, com aumento da produção de óxido nítrico (Fulton *et al.*, 2001).

A ativação da fosfolipase C também aumenta a produção de diacilglicerol, que ativa a PKC com conseqüente fosforilação protéica (Sunako *et al.*, 1990), que é essencial para vários processos celulares. A fosforilação da cadeia leve de miosina e do transportador Na^+/H^+ localizado na membrana plasmática, por exemplo, promovem contração do músculo liso e alcalinização celular, respectivamente. A formação do DAG pode ser mediada também através da ativação da fosfolipase D, que induz a formação do ácido fosfatídico, a partir da fosfatidilcolina, que será convertido em DAG (Ambar e Sokolovsky, 1993). A

ativação da fosfolipase D pelas ETs pode ocorrer por via direta ou através da estimulação da PKC (Billah *et al.*, 1991).

Outras alterações imediatas na função celular induzida pela ativação dos receptores endotelinérgicos são a ativação da fosfolipase A₂, modulação da atividade da AC ou da GC ou ainda o fechamento dos canais de K⁺ da membrana celular, com conseqüente despolarização e contração do músculo liso (Sokolovsky, 1992; Miyoshi *et al.*, 1992). A ET-1 estimula a fosfolipase A₂ nas células musculares lisas (Resink *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*, 1989) com conseqüente síntese de vários prostanóides (De Nucci *et al.*, 1988; D'Orléans-Juste *et al.*, 1992). Não está claro se a estimulação é mediada diretamente por proteína G (Resink *et al.*, 1989) ou via proteína quinase C, que pode ser ativada através das vias da fosfolipase C e D (Wright e Malik, 1996), e/ou proteína quinase ativadora de mitógeno (Husain e Abdel-Latuf, 1999). Em algumas células, a ET-1 pode também aumentar a expressão de fosfolipase A₂ e ciclooxigenase-2, mas não ciclooxigenase-1 (Schramek *et al.*, 1994; Gallois *et al.*, 1998).

A ET-1 é também um potente mitogênico em cultura de diversas células, inclusive na célula muscular lisa vascular, e indutor da expressão de vários pró-oncogenes, tais como *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* (Simonson, 1993). Esta constatação vem embasada em estudos nos quais ambos os receptores endotelinérgicos são capazes de estimular a cascata quinase intracelular, mais precisamente a MAPK (Wang *et al.*, 1994). A ativação desta proteína quinase é

mediada tanto por via dependente de PKC, como por via que é independente deste fator e sensível a toxina *pertussis* (Sugawara *et al.*, 1996). Além disso, a atividade mitogênica das ETs também se deve à ativação dos receptores tirosina-quinase e conseqüente estimulação da MAPK (Cazaubon *et al.*, 1994). Como podemos constatar, os mecanismos de transdução das ETs são bastante variados, podendo envolver desde efeitos celulares rápidos como ativação de diferentes canais até processo celulares mais lentos, como a mitogênese.

1.3. - Endotelinas no sistema hepato-biliar

As ETs e os seus receptores estão amplamente distribuídos no sistema hepatobiliar. Nesse sentido, há evidências de que a ET-1 é sintetizada por hepatócitos (Kuddus *et al.*, 2000), células esteladas (Pinzani *et al.*, 1996), células endoteliais dos sinusóides hepáticos (Eakes *et al.*, 1997), células epiteliais que revestem os ductos biliares intra e extrahepático (Housset *et al.*, 1993a) e mastócitos peribiliares (Koda *et al.*, 2000). Além disso, ambos os receptores para as ETs foram detectados no fígado. Nas células esteladas há uma clara predominância de receptores ET_A sobre receptores ET_B, sendo que o inverso é observado nas células endoteliais sinusoidais (Housset *et al.*, 1993b; Yokomori *et al.*, 2001) e nas células de Kupffer (Stephenson *et al.*, 1995). A importância fisiológica da ET-1 neste órgão tem sido relacionada, principalmente, com seus efeitos sobre o fluxo sanguíneo hepático (para revisão ver Mallat e Lotersztajn, 1996). No entanto, também já foram descritos efeitos extra-vasculares do peptídeo, tais como estimulação da glicogenólise

(Serradeil-Le *et al.*, 1991) e do fluxo biliar, sendo este último mediado através de aumento da secreção de ácidos biliares (Tanaka *et al.*, 1994) e da frequência de contração dos canalículos biliares intra-hepáticos (Kamimura *et al.*, 1993).

Os níveis intra-hepáticos de ET-1 estão elevados acentuadamente nos casos de dano hepático causado por galactosamina ou endotoxina bacteriana (Ohuchi *et al.*, 1995), pacientes com cirrose (Pinzani *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2000), bem como em modelos pré-clínicos de cirrose induzida por ligação do ducto biliar comum ou por tetracloreto de carbono (Gandhi *et al.*, 1996; Rockey *et al.*, 1998). O aumento dos níveis de ET-1 durante a cirrose se deve não somente ao aumento da síntese (principalmente pelas células esteladas hepáticas), mas também devido à redução do metabolismo deste peptídeo (Kuddus *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1998), e se apresenta acompanhado de aumento significativo da densidade dos receptores ET_A e ET_B hepáticos (Gandhi *et al.*, 1996; Rothermund *et al.*, 2000; Yokomori *et al.*, 2001). Além disso, a administração de antagonistas seletivos de receptor ET_A e/ou de antagonistas não seletivo de receptores ET_A/ET_B reduzem a hipertensão portal (Reichen *et al.*, 1998; Sogni *et al.*, 1998) e a fibrose associada com a cirrose induzida experimentalmente (Rockey e Chung, 1996; Cho *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2000).

Em relação ao trato biliar, convém lembrar que a sua função no sistema hepatobiliar está relacionada com a coleta da bile secretada pelos hepatócitos, modificação de seu volume e composição, bem como o seu armazenamento na

VB até ser despejada no duodeno em resposta a alimentação. Neste sentido, a ET-1 em baixas concentrações estimula o fluxo biliar por aumentar o transporte de ácidos biliares dos hepatócitos para os canalículos hepáticos (Tanaka *et al.*, 1994). Achados recentes confirmam esta hipótese, revelando que o dano hepático induzido pelo bosentan, antagonista não-seletivo de receptores ET_A e ET_B, é mediado, pelo menos em parte, pela inibição da bomba de extrusão de sais biliares presente no pólo biliar do hepatócito, com conseqüente citotoxicidade devido ao acúmulo intracelular de sais (Fattinger *et al.*, 2001). Além disso, células epiteliais cultivadas da VB e do trato biliar intra- e extra-hepático humano expressam RNAm para a ET-1 e efetivamente secretam esse peptídeo (Housset *et al.*, 1993a). As células epiteliais da VB humana, mais especificamente, secretam principalmente ET-1, apesar de também expressarem RNAm para os precursores da ET-2 e ET-3 (Fouassier *et al.*, 1998). Esses mesmos autores verificaram, ainda, que estas células expressam uma população de receptores predominantemente do tipo ET_B, cuja ativação deflagra um nítido efeito supressor sobre a secreção de ânions, mediado através de inibição da AC por proteína G_{i/o}. Assim, é possível que a ET-1 sintetizada pelo epitélio biliar esteja implicada, através de ação autócrina e/ou parácrina, nos mecanismos fisiológicos que regulam a concentração e a composição da bile. Estes dados podem ter relevância fisiopatológica, considerando que a concentração de ET-1 está quadruplicada na bile coletada do ducto biliar comum de pacientes que sofreram transplante de fígado, e concentrações ainda mais elevadas são

encontradas na VB de pacientes submetidos a colecistectomia (Kraus *et al.*, 1996).

O armazenamento da bile no trato biliar e o seu fluxo para a luz intestinal são dependentes do gradiente entre a pressão hidrostática acarretada pela secreção biliar pelas porções intra-hepáticas iniciais do trato biliar e as pressões relativas desenvolvidas na VB, ductos cístico e biliar comum e esfíncter de Oddi, as quais são controladas por mecanismos neuroendócrinos de controle do tônus da musculatura lisa contida em várias destas estruturas (para revisão ver Shaffer, 2000). A contração muscular da VB é primordial para que a bile chegue no duodeno. Neste sentido, tem sido demonstrado que a ET-1, além de aumentar a frequência de contração dos canalículos biliares que se formam entre hepatócitos cultivados de rato (Kamimura *et al.*, 1993), é um potente agente contrátil em tiras de VB isolada de cobaia, sendo quase tão potente quanto o octapeptídeo C-terminal da colecistocinina (CCK-8) (Moumami *et al.*, 1992; Battistini *et al.*, 1994; Cardozo *et al.*, 1997).

Embora alguns autores tenham advogado a existência de uma população atípica de receptores endotelinérgicos na VB de cobaia (Battistini *et al.*, 1994), estudos posteriores demonstraram que a contração induzida pela ET-1 nessa preparação é mediada por ativação de receptores ET_A e ET_B (Cardozo *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001). Este último estudo também demonstrou a presença de ambos os receptores na musculatura lisa da VB humana. Além disso, efeitos contráteis produzidos na VB de cobaia pelos precursores imediatos da ET-1 e

ET-2, big-ET-1 e big-ET-2, respectivamente, dependem provavelmente da sua conversão nos seus respectivos metabólitos ativos por ação de ECE presente no tecido, uma vez que estes precursores competem muito fracamente com a ET-1 marcada por sítios específicos em membranas celulares obtidas de VB de cobaia (Battistini *et al.*, 1995). Convém salientar que esse tecido parece apresentar uma ECE-1 que converte a big-ET-1 e big-ET-2 exógenas, mas não big-ET-3 (Battistini *et al.*, 1995; Cardozo, 1996).

Por outro lado, considerando que, na época em que demos início ao presente estudo, a totalidade dos estudos investigando ações das ETs sobre a VB havia sido realizada em cobaia, julgamos que seria bastante pertinente avaliar a influência destes peptídeos sobre a motilidade da VB de outra espécie. Por outro lado, há evidências de que o efeito contrátil induzido pela ET-1 na VB de cobaia é mediado tanto por receptores ET_A quanto ET_B e é reduzido significativamente por inibidores de ciclooxigenase, bloqueio de canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo “L” ou por remoção de Ca^{2+} da solução fisiológica (Moumami *et al.*, 1992; Cardozo, 1996). Diante disso, pareceu-nos também oportuno investigar se as vias de sinalização celular recrutadas por cada tipo de receptor endotelinérgico para indução de contração da VB poderiam apresentar diferenças no que tange à mobilização de prostanóides e de Ca^{2+} .

2. OBJETIVOS

2.1. – Objetivo Geral

O presente estudo foi realizado com o objetivo de aprofundar os conhecimentos acerca das ações contráteis das ETs na VB de cobaia, comparando-as com o perfil de ação apresentado em VB de outra espécie, o coelho. Além disso, avaliar a importância dos prostanóides e do Ca^{2+} intracelular nas contrações induzidas pelas ETs, por ativação de receptores ET_A e ET_B .

2.2. - Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral acima proposto foram postulados os seguintes objetivos específicos:

2.2.1 - Caracterizar os efeitos contráteis da ET-1 na VB isolada de coelho, comparando-os aos da CCK-8, carbacol, serotonina e histamina.

2.2.2 - Identificar, através de estudos funcionais com agonistas e antagonistas, os receptores endotelinérgicos que medeiam os efeitos das ETs na VB isolada de coelho.

2.2.3 - Avaliar a participação dos prostanóides na mediação das contrações induzidas pelas ETs na VB isolada de cobaia através do emprego da indometacina (INDO), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase.

2.2.4 – Investigar a liberação de prostanóides pela VB isolada de cobaia exposta às ETs através da técnica de radioimunoensaio.

2.2.5 – Avaliar, simultaneamente através do emprego de transdutores de força isométricos e da técnica do fura-2, o desenvolvimento das contrações e das alterações na $[Ca^{2+}]_i$ livre da VB de cobaia em resposta à ET-1, através de receptores ET_A e ET_B , e SRTX, somente via receptores ET_B , na ausência ou presença de INDO.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. - Animais

Os experimentos foram realizados com cobaias e coelhos de ambos os sexos, pesando entre 250 e 300 g ou 3,0 e 3,5 Kg, respectivamente. As cobaias utilizadas foram obtidas do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC ou do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Sherbrooke, (Sherbrooke, Canadá). Os coelhos utilizados foram comprados pelo Biotério Central da UFSC. As cobaias foram alojadas em caixas coletivas, 6 a 8 por caixa, e os coelhos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo/claro escuro de 12 h. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia (ou Biotério Central da Universidade de Sherbrooke) por pelo menos uma semana antes de serem utilizados.

3.2. - Contrações isométricas da vesícula biliar de coelho e de cobaia

Os animais foram anestesiados levemente com éter, e em seguida sacrificados com um golpe na cabeça e deslocamento cervical. Após a laparotomia, a vesícula biliar foi retirada, com o cuidado de esgotar a bile, e colocada numa placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (ver composição a seguir) morna para remoção de tecidos aderentes. As vesículas de coelho foram divididas em 4 tiras circulares semelhantes

(5 mm por 15 mm; $15,4 \pm 0,6$ mg, $n = 148$) e as de cobaia em 4 tiras longitudinais semelhantes (3 mm por 10 mm; $7,6 \pm 0,3$ mg, $n = 150$). Preparações de ambas espécies foram então transferidas para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit (composição mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,2; KH_2PO_4 0,9; NaHCO_3 25 e glicose 11- pH 7.2-7.4) aquecida a 37°C e borbulhada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 , conectadas a um transdutor isométrico e submetidas a uma tensão inicial de 0,5 g. As contrações isométricas foram registradas por miógrafos (F-60 myograph microdisplacement transducer, Narco Biosystems, EUA) acoplados a um polígrafo de mesa (DMP-4B, Narco Biosystems, EUA).

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

3.2.1. - Experimentos com a vesícula biliar de coelho

Trinta minutos após a exposição ao KCl 80 mM, as preparações foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de ET-1 (0,1 a 100 nM), octapeptídeo sulfatado de colecistocinina (26-33) (CCK-8; 0,1 a 100 nM), carbacol (0,1 nM a 1 mM), serotonina (0,1 nM a 3 μ M) ou histamina (0,1 nM a 3 μ M). Cada concentração de agonista foi adicionada apenas após a estabilização do efeito da concentração precedente, e somente uma curva concentração-efeito cumulativa foi obtida em cada preparação.

Com o propósito de identificar os receptores endotelinérgicos envolvidos no efeito contrátil induzido pela ET-1 na vesícula biliar isolada de coelho, comparou-se o perfil de ação de diferentes agonistas, bem como a influência de diferentes antagonistas desses receptores. Nesse sentido, foram obtidas curvas concentração-efeito cumulativas aos efeitos contráteis da ET-1 ou ET-3, ou dos agonistas seletivos de receptores ET_B SRTX ou IRL 1620 (todos de 0,1 a 100 nM). Com relação aos antagonistas, avaliou-se as suas influências sobre respostas contráteis induzidas pela ET-1, ET-3 ou SRTX. Nesses experimentos, testou-se a influência da incubação com o BQ-123 (3 μ M - antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A), A-127722-5 (0,1 e 0,3 μ M - antagonista não peptídico seletivo de receptores ET_A) e o BQ-788 (0,3 e 1 μ M - antagonista peptídico seletivo de receptores do tipo ET_B). Cada qual foi

adicionado à cuba 20 min antes de iniciar a construção da curva concentração-efeito ao agonista na sua presença. Convém esclarecer, ainda, que cada preparação foi exposta a uma única concentração de antagonista ou veículo (igual volume de tampão fosfato ou etanol 10%). A especificidade de ação dos antagonistas de receptores endotelinérgicos foi verificada testando-se sua influência sobre a resposta contrátil da vesícula biliar ao carbacol.

Para confirmar a atividade das amostras dos antagonistas endotelinérgicos utilizados nos experimentos com vesícula biliar de coelho, os mesmos foram testados em anéis de aorta torácica de coelho. Para tal, após o sacrifício, a cavidade torácica foi aberta para a retirada da aorta torácica, que foi colocada numa placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (mesma composição citada anteriormente, exceto pela adição de EGTA 0,02 mM e ácido ascórbico 0,01 mM) morna para remoção cuidadosa dos excessos de tecido adiposo adjacente e divisão em 8 anéis semelhantes de cerca de 8-10 mm de comprimento. O endotélio foi removido pela introdução de uma haste metálica na luz do anel e rolagem repetida da preparação sobre papel de filtro umedecido com solução nutriente. Em seguida, cada preparação foi transferida para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, nas mesmas condições descritas anteriormente, suspensas entre duas hastes metálicas, uma das quais conectada a um transdutor isométrico, e distendida a uma tensão basal

de 2,0 g. Após um período de estabilização de pelo menos 1 h, com renovações da solução nutriente a cada 15 min, cada preparação foi contraída com fenilefrina (300 nM) e exposta, na presença do vasoconstritor, à acetilcolina (1 μ M). Apenas anéis em que houve total ausência de relaxamento em resposta à acetilcolina foram considerados desprovidos de endotélio. Confirmada a remoção do endotélio, cada preparação foi lavada repetidas vezes com solução nutriente e exposta, 30 min depois, a BQ-123 (3 μ M), A-127722-5 (0,3 μ M) ou BQ-788 (1 μ M), ou igual volume de veículo. Decorridos 20 min de incubação, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas ao efeito vasoconstritor da ET-1 ou da SRTX (0,1 a 100 nM), na ausência ou presença de um antagonista.

3.2.2. - Experimentos com a vesícula biliar de cobaia

Obtida a resposta ao KCl 80 mM, as preparações foram lavadas diversas vezes em meio de Krebs e estabilizadas por mais 30 min. Em seguida, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para ET-1, ET-3, SRTX (todos 0,1 a 100 nM) ou carbacol (100 nM a 1 mM), na ausência ou presença de indometacina (INDO) 5,6 μ M por 30 min. Um outro grupo de experimentos avaliou a influência dos antagonistas BQ-123 ou BQ-788 (ambos 1 μ M por 20 min) sobre as respostas da vesícula biliar

isolada de cobaia induzida pela ET-1, ET-3 ou carbacol. Além disso, foi verificada ainda a influência da INDO sobre as contrações induzidas pela ET-3 na presença de cada antagonista, BQ-123 ou BQ-788, para bloquear os receptores ET_A ou ET_B , respectivamente.

3.3. - Dosagem de prostanóides

Cobaias foram sacrificadas conforme descrito anteriormente, e a vesícula biliar retirada e separada de tecidos aderentes. Em seguida, cada vesícula foi dividida em 8 tiras longitudinais e todos estes segmentos foram colocados em um frasco de vidro contendo 2,5 ml de solução de Krebs oxigenada (5% de CO_2 em 95% de O_2) a $37^\circ C$ e pH 7,4. Após 1 h de equilíbrio, com renovação do líquido nutriente a cada 15 min, as tiras foram transferidas, consecutivamente e a cada 20 min, para novos frascos contendo apenas a solução fisiológica (controle) ou solução acrescida de 1, 10 e 100 nM dos peptídeos a serem testados. O tempo de 20 min foi determinado como período ideal, a partir de experimentos preliminares onde tiras de vesícula biliar de cobaia foram expostas à ET-1 (100 nM - maior concentração utilizada) e foram obtidas amostras para determinação da liberação de 6-ceto-PGF_{1 α} a cada 2 minutos, nos primeiros 20 minutos, e a cada 10 minutos até completar 1 h. Assim, ao término de cada período de 20 min, após a remoção das tiras de vesícula, a solução foi imediatamente congelada (sem extração) a $-20^\circ C$, para posterior dosagem de prostanóides

por radioimunoensaio. Em todo procedimento era mantido, paralelamente, um frasco contendo apenas Krebs (i.e. sem tecido), nas mesmas condições experimentais, como controle negativo adicional.

A dosagem da concentração de 6-ceto-PGF_{1α} (o metabólito estável da PGI₂) e de TXB₂ (o metabólito estável da TXA₂) nas amostras obtidas foi realizada por ensaio radioimunológico, através do método previamente descrito (Salmon, 1978). Os anti-soros foram reconstituídos em 10 ml de solução tampão Tris 0,1% (50 nM; pH 7,4) contendo 0,1% de gelatina e 0,1% de azida de sódio. Esta solução do anti-soro tem uma ligação específica com o seu antígeno de aproximadamente 50%. O anti-soro utilizado contra a 6-ceto-PGF_{1α} apresenta uma reação cruzada de 100% com a 6-ceto-PGF_{1α}, 23% com a PGE₁, 4% com a PGE₂, 7% com a PGF_{2α} e menos de 1% com a TXB₂. O anti-soro utilizado contra o TXB₂ tem uma reatividade cruzada de 100% com a TXB₂, menos de 2% com a PGD₂ e PGF_{2α} e menos de 0,1% com a 6-ceto-PGF_{1α} e PGE₂. Os dois anti-soros utilizados não apresentaram reação cruzada com os diferentes peptídeos testados neste estudo (resultados não mostrados).

Os eicosanóides radiomarcados com trício (³H-6-ceto-PGF_{1α} ou ³H-TXB₂) foram preparados diluindo-se 1 μl do marcador em 10 ml de Tris 0,1%. A intensidade da radioatividade em todas as amostras foi avaliada em condições nas quais a ligação total (i.e. as contagens efetuadas

nos tubos de ensaio contendo apenas Tris 0,1% mais o eicosanóide radiomarcado) situava-se entre 2.000 a 2.500 c.p.m.

As curvas-padrão foram realizadas utilizando-se as concentrações de 0; 0,5; 1; 2; 3,5; 5; 10 e 20 ng/ml de 6-ceto-PGF_{1α} e TXB₂. Todas as diluições das soluções da curva-padrão foram feitas com a solução de Tris 0,1% (pH 7,4), sempre a partir de uma mesma solução estoque contendo 0,5 µg/ml de 6-ceto-PGF_{1α} ou de TXB₂.

Uma vez reconstituído o anti-soro, diluído o eicosanóide marcado e realizadas as diluições para a curva-padrão, os tubos de ensaio foram preparados de acordo com o protocolo descrito na Tabela 1. Convém salientar que as avaliações tanto dos padrões quanto das amostras coletadas foram feitas em duplicata.

Uma vez completado o protocolo da Tabela 1, todos os tubos foram agitados, vedados com Parafilm[®] e deixados a 4°C por 12 a 16 h. Após este período, a bateria de tubos foi transferida da geladeira para gelo, e adicionou-se 100 µl de uma suspensão de 2% de carvão ativado em tampão Tris 0,1% e dextrano 0,4% a cada tubo, exceto aos tubos 1 e 2. Em seguida, os tubos foram agitados e centrifugados, 10 min depois, a 1.500 g (centrífuga Beckman TJ-6) por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para frasco de poliestireno próprio para cintilador, acrescido de 4 ml de líquido para cintilação e vigorosamente

agitado. As leituras foram realizadas em períodos de 2 min por um contador de emissão β (Beckman LS 6800).

Tabela 1 – Protocolo geral utilizado para determinação de eicosanóides por radioimunoensaio.

Tubo	Finalidade ou concentração	Volume adicionado (em μl)				
		Padrão	Tris 0,1%	Amostras	Anti-soro	[^3H]
1-2	[^3H] Total	-	250	-	-	50
3-4	Ligação não-específica	-	150	-	-	50
5-6	Ligação total (0 ng/ml)	-	100	-	50	50
7-8	0,5 ng/ml	50	50	-	50	50
9-10	1 ng/ml	50	50	-	50	50
11-12	2 ng/ml	50	50	-	50	50
13-14	3,5 ng/ml	50	50	-	50	50
15-16	5 ng/ml	50	50	-	50	50
17-18	10 ng/ml	50	50	-	50	50
19-20	20 ng/ml	50	50	-	50	50
21 até n	amostras experimentais	-	-	100	50	50

Com o objetivo de determinar a liberação basal de 6-ceto-PGF_{1α} ou TXB₂ durante a realização de todo o protocolo experimental realizado para os peptídeos testados, as tiras de vesícula biliar de cobaia foram expostas apenas à solução de Krebs-Henseleit.

Curvas concentração-efeito para liberação dos prostanóides foram construídas de modo cumulativo para ET-1, ET-3 ou SRTX (1, 10 e 100 nM). Nas amostras expostas à ET-1 foram determinadas as concentrações liberadas de PGI₂ e TXA₂, e naquelas estimuladas pela ET-3 ou SRTX, somente a liberação de PGI₂ foi realizada. Outros experimentos foram conduzidos na presença de INDO (5,6 μM), incubada 30 min antes da adição da ET-1 (100 nM), ou somente na presença da vesícula biliar de cobaia.

3.4. - Avaliação simultânea da contração e concentração de Ca²⁺ intracelular

As tiras de vesícula biliar de cobaia foram obtidas nas mesmas condições descritas anteriormente e colocadas numa placa de Petri contendo uma solução fisiológica com a seguinte composição (em mM): NaCl 137; KCl 5,4; MgCl₂.6H₂O 1,0; CaCl₂ 1,5; glicose 5,5; EDTA 0,01; HEPES 20,0 - pH 7.4). Em seguida, uma extremidade de cada preparação foi fixada num suporte de polietileno especial com ponta metálica, que foi inserido no interior de uma cubeta de quartzo contendo 50 μl da forma

esterificada da sonda de cálcio fura-2, o fura-2 acetóxi-metil-éster (fura-2/AM: 4 μ M), em 2,45 ml de solução fisiológica oxigenada (95% de O₂ e 5% de CO₂) e agitada, contendo 0,3% de albumina de soro bovina (BSA). Após um período de incorporação de fura-2/AM de 1 h, a cubeta (com a preparação) foi inserida num fluorímetro Deltascan (Photon Technology International Inc., PTI, Princeton, NJ, EUA), mantida a 37°C, e lavada continuamente, a 1,2 ml/min e por 30 min, para remoção do fura-2/AM residual do meio extracelular e hidrólise completa da forma esterificada do fura-2.

Decorrida a lavagem, a outra extremidade da tira de vesícula biliar de cobaia foi conectada a um transdutor isométrico (Grass FT03) e submetida a uma tensão inicial de 0,5 g. As contrações isométricas foram registradas por um polígrafo (Grass – modelo 7D). Em todos os ensaios, realizados sempre no escuro, permitiu-se um período de estabilização de no mínimo 1 h antes de qualquer nova intervenção experimental. Simultaneamente ao registro de tensão isométrica, a preparação foi excitada, alternadamente, com pulsos de luz a 340 e 380 nm, através de um feixe de fibras ópticas de 3 mm de diâmetro. Por sua vez, a fluorescência emitida pela preparação foi coletada, por fibras ópticas dispostas em torno dos feixes de excitação (círculo de 7 mm de diâmetro), e lida no comprimento de 510 nm (ver Figura 3 para esquema geral da montagem).

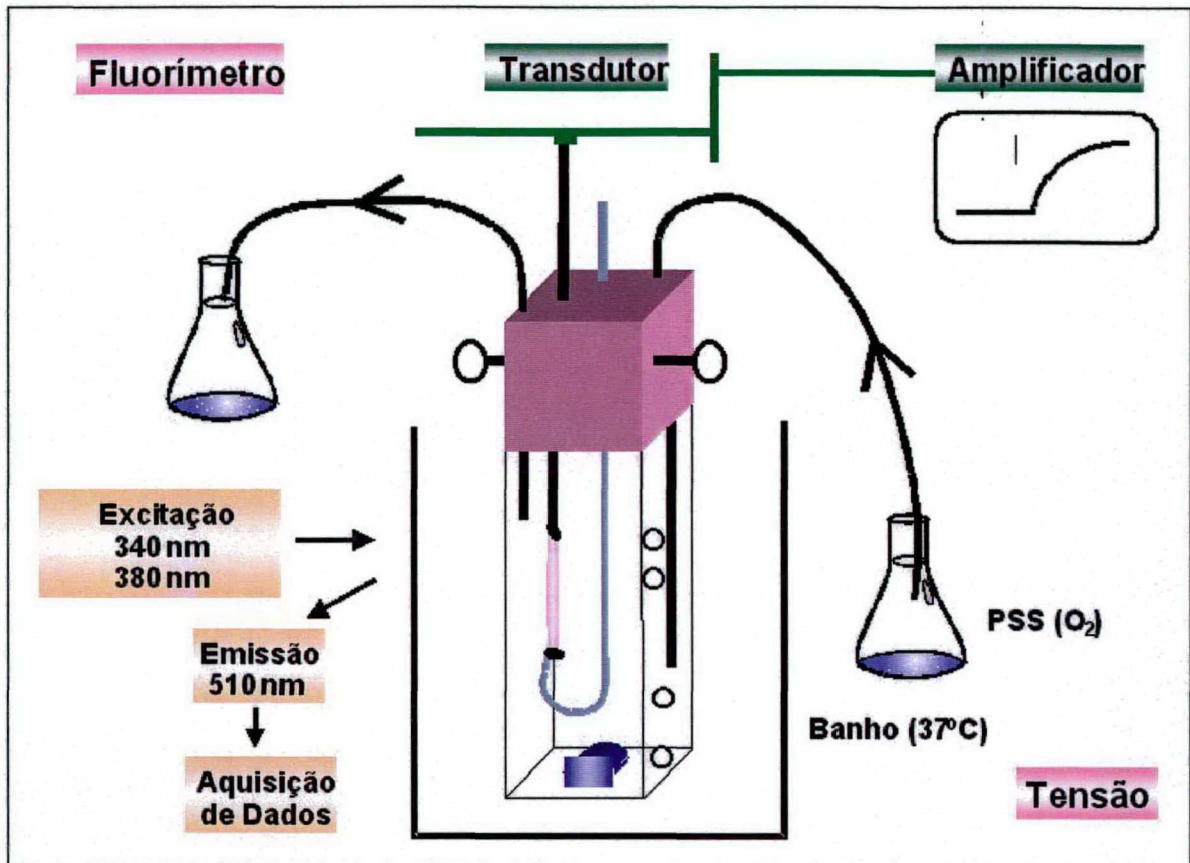


Figura 3 – Diagrama esquemático da metodologia empregada para estudo simultâneo da contração e alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} livre.

O fura-2 é um corante fluorescente de alta afinidade pelo cálcio. Quando administrado na forma acetóxi-metil-éster, ele penetra passivamente na célula, onde é hidrolisado à sua forma ácida. Nesta condição, o fura-2 tem um espectro de excitação distinto de acordo com sua ligação ao cálcio intracelular. Quando livre, a emissão máxima de luz se dá quando o fura-2 é excitado a 380 nm. Já quando se analisa o complexo fura-2-cálcio, a emissão máxima ocorre em excitações próximas de 340 nm. O comprimento de onda da leitura das fluorescências emitidas foi de 510 nm. Assim, as razões das intensidades de luz emitida a 510 nm obtidas após excitação alternada da preparação a 340 e a 380 nm (R340/380) têm variações diretamente proporcionais às modificações na concentração de cálcio intracelular livre.

Após a lavagem e a estabilização de 1 h, curvas concentração-efeito cumulativas foram construídas para a ET-1 ou SRTX (1, 10 e 100 nM), na ausência ou presença de INDO (5,6 μM), incubada no mínimo 30 min antes da adição do peptídeo. As R340/380 máximas (R_{MAX} – fluorescência máxima do fura-2 na presença de uma concentração saturada de cálcio) e mínimas (R_{MIN} – fluorescência mínima do fura-2 na presença de uma concentração mínima de cálcio) foram determinadas através da utilização de um ionóforo de cálcio, a ionomicina (10 μM) que permeabiliza as células ao Ca^{2+} (R_{MAX}) e um quelante de cálcio, o EGTA (20 mM) (R_{MIN}),

respectivamente, que foram adicionados à cubeta ao final de alguns experimentos.

3.5. – Apresentação dos resultados e análise estatística

As contrações induzidas pelos agonistas na vesícula biliar isolada de coelho e cobaia são apresentadas como porcentagens da resposta ao estímulo padrão KCl 80 mM (tomada como 100%). Por outro lado, as contrações induzidas por ET-1 ou SRTX em anéis de aorta torácica de coelho são apresentadas como tensão absoluta (em g). Os resultados destes experimentos são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Como alguns agonistas não induziram uma resposta máxima até a maior concentração testada (100 nM, resposta à qual denominamos E_H), as potências dos agonistas foram expressas como CK_{50} (i.e. a concentração que causa contração equivalente a 50% da resposta ao KCl 80 mM), e são apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança para 95% (Fleming *et al.*, 1972; Cardozo *et al.*, 1997).

No radioimunoensaio, a quantificação do conteúdo de eicosanóides nas amostras foi feita por computador, através do programa Excel[®] com interpolação da curva-padrão. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), expressos em ng de prostanóides por ml de amostra.

Nos experimentos para avaliação simultânea da contração e concentração de Ca^{2+} intracelular, as contrações induzidas pelos peptídeos na vesícula biliar de cobaia são apresentadas como tensão absoluta (em mg). Por outro lado, a variação da concentração de Ca^{2+} é expressa como porcentagem de aumento da razão da intensidade de fluorescência do Ca^{2+} (i.e. R340/380), quando comparado ao valor basal. Todos os resultados obtidos foram coletados através de um sistema de aquisição de dados computadorizado. O programa Deltascan[®], em conjunção com o programa PTI, possibilitou tanto o controle do aparelho, quanto a aquisição de dados e a sua análise. Os resultados obtidos em ambos os ensaios são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

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

3.6. - 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).

A ET-1, a ET-3, a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 [Suc-(Glu⁹, Ala^{11,15})-ET-1] foram adquiridos da American Peptide Company (Sunnyvale, CA, EUA). O BQ-123 [ciclo (D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu)] e o BQ-788 (N-cis-2,6-dimetil-piperidinocarbonil-L-gama-metileucil-D-1-metóxi-carbonil-triptofanil-D-norleucina) foram gentilmente cedidos pelo Instituto de Farmacologia de Sherbrooke (Quebec, Canadá). O A-127722-5 (trans -trans-2-(4-metoxi-fenil)-4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-((N,N-dibutil-amino) carbonil-metil) pirrolidina-3-ácido carboxílico) foi gentilmente doado pela Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, EUA). O dimetilssulfóxido foi obtido da Merck A. G. (Rio de Janeiro - Brasil ou Darmstadt - Alemanha). O fragmento 26-33 amida sulfatado [Tyr(SO₃H)²⁷]-colecistocinina (CCK-8), cloridrato de carbacol, difosfato de histamina, fenilefrina, acetilcolina, indometacina, ácido ascórbico, ionomicina, EDTA, EGTA, HEPES, PBS, 6-ceto-PGF_{1α}, TXB₂, anti-soro para 6-ceto-PGF_{1α}, antisoro para TXB₂, cremofor EL, carvão ativado e dextrana foram obtidos da Sigma Chemicals Company (St. Louis, MO, EUA). O fura-2/AM foi adquirido da Calbiochem (La Jolla, CA, EUA), o [³H]- 6-ceto-PGF_{1α} da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EUA) e o [³H]- TXB₂ da Amersham Life Science (Arlington Heights, IL, EUA).

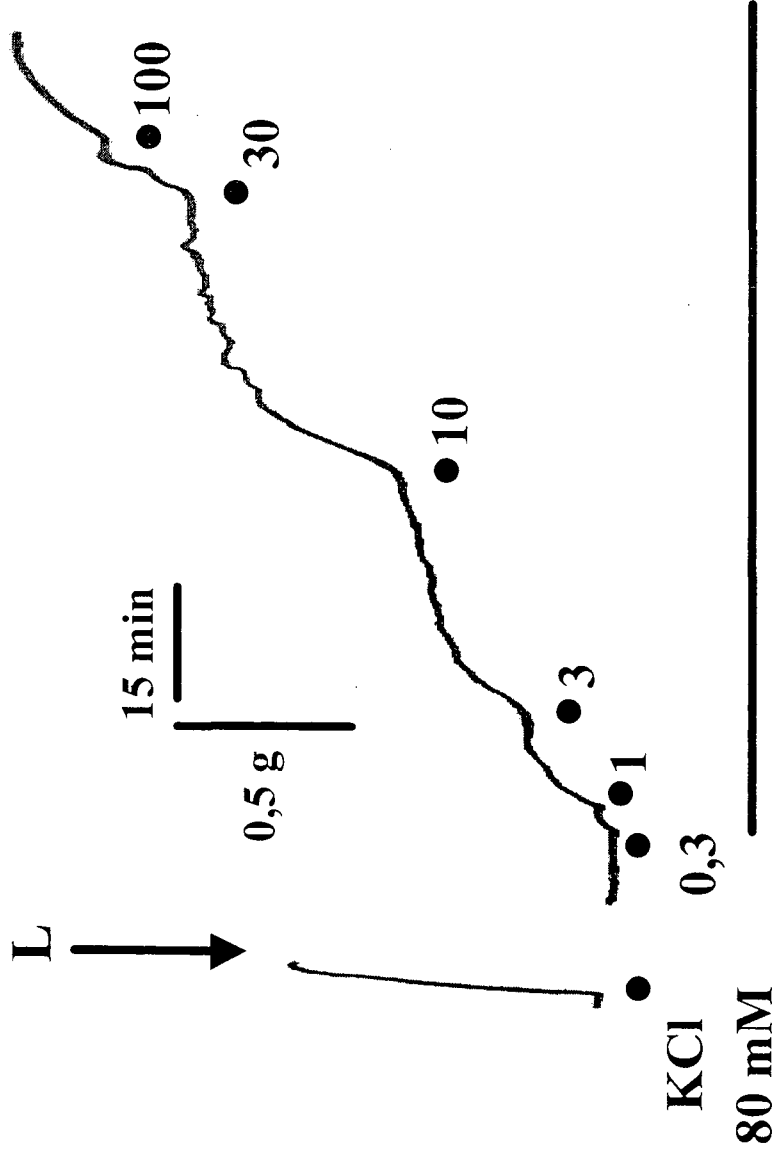
A maioria das soluções estoque foi preparada com tampão fosfato. O IRL 1620 foi dissolvido em hidróxido de sódio 0,01 N, o A127722-5 em etanol 10% e a indometacina em tampão básico de Tris (0,2 M). O fura-2 acetóxi-metil-éster foi dissolvido em clorofórmio P.A., evaporado e os tubos de eppendorffs armazenados na geladeira (4°C), cuidadosamente protegidos de luz por revestimento em papel alumínio. O preparo da solução para incorporação do fura-2/AM foi realizado imediatamente antes de ser utilizado, em 10% de DMSO, 80% de PSS/BSA e 10% de cremofor EL (0,2%), este último um detergente não citotóxico que aumenta a solubilidade da sonda de cálcio.

A maior parte das drogas foi armazenada na forma de soluções estoque (10 μ M a 1 mM), mantidas em tubos siliconizados a -20°C, e diluídas até a concentração desejada imediatamente antes do uso. Todas as concentrações de drogas mencionadas no texto correspondem à concentração final das mesmas no banho.

4. RESULTADOS

4.1. - Vesícula biliar isolada de coelho

Tiras de VB isolada de coelho expostas à solução de KCl (80 mM) responderam com contração sustentada média de $0,47 \pm 0,02$ g de tensão por 10 mg de tecido úmido ($n = 130$), que se estabilizou dentro de aproximadamente 10 min. A adição de concentrações cumulativas crescentes de ET-1 (0,1-100 nM) causou contrações tônicas gradativas da preparação, que se desenvolveram muito lentamente (Figura 4). A contração máxima induzida pela ET-1 mostrou-se resistente a múltiplas lavagens consecutivas da preparação. Os outros agonistas testados, CCK-8, serotonina e carbacol, também causaram contrações sustentadas da preparação, porém tais respostas se desenvolveram muito mais rapidamente que aquelas induzidas pela ET-1. Além disso, as contrações máximas causadas por esses agonistas foram prontamente revertidas após a lavagem. A Figura 5 e a Tabela 2 apresentam os resultados médios desses experimentos. A ET-1 foi aproximadamente 20 e 100 vezes mais potente que a serotonina e o carbacol, respectivamente, e cerca de 40 vezes menos potente que a CCK-8. A histamina foi inativa até a concentração de 3 μ M.



Endotelina-1 [nM]

FIGURA 4 – Registro isométrico típico dos efeitos contráteis induzidos, em tira de vesícula biliar isolada de coelho, pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de endotelina-1. “L” indica 3 lavagens sucessivas da preparação com solução de Krebs-Henseleit normal. O traçado foi obtido de uma tira pesando 15,8 mg e é representativo da média de mais de 20 experimentos.

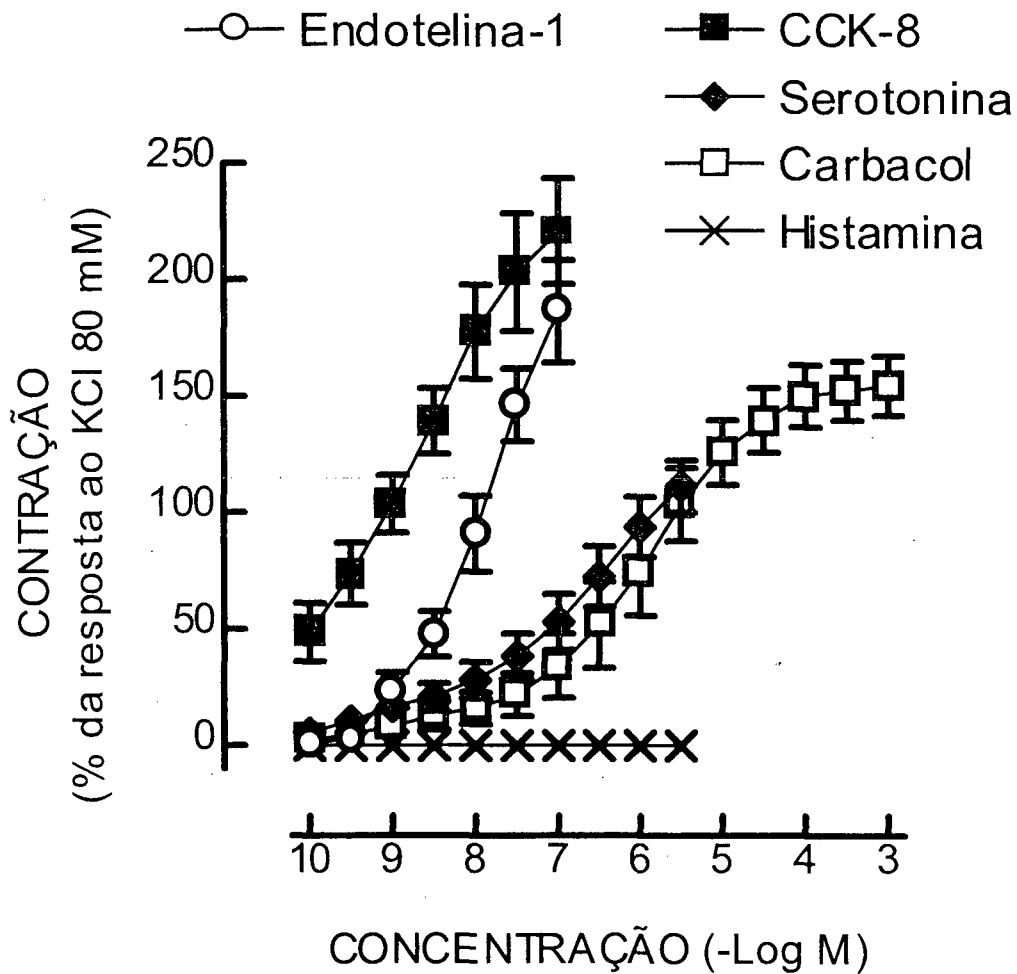


FIGURA 5 – Curvas concentração-resposta médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, colecistocinina sulfatada (26-33) (CCK-8), serotonina, carbacol e histamina na vesícula biliar isolada de coelho. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6 experimentos.

TABELA 2 - Efeitos contráteis de diferentes agonistas em tiras de vesícula biliar isolada de coelho. Para fins de comparação, também são apresentados resultados análogos obtidos em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. As CK_{50} s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. Os E_H s estão expressos como a média \pm E. P. M., como porcentagens da resposta de cada preparação ao KCl 80 mM. O valor de “n” indica o número de experimentos.

ANIMAL	AGONISTA	CK_{50} nM	E_H (%)	n
Coelho	Endotelina-1	3,4 (1,2-9,3)	186 \pm 22	6
	Colecistocinina	0,085 (0,017-0,416) *	221 \pm 23	5
	Carbacol	352 (58,1-2131,2) *	155 \pm 13	5
	Serotonina	78,3 (13,1-476,9) *	111 \pm 11*	5
	Histamina	-	Inativo até 3 μ M	6
Cobaia ^a	Endotelina-1	0,8 (0,2-4,1)	129 \pm 10	6
	Colecistocinina	2,2 (0,7-3,5)	197 \pm 7	6
	Carbacol	87,5 (45,6-168,0)	197 \pm 7	6
	Histamina	330 (111-998)	178 \pm 5	6

* $P < 0.05$ quando comparado ao valor correspondente à endotelina-1 (teste “t” de Student para amostras não pareadas). ^aResultados relatados por Cardozo (1996) e Cardozo *et al.*(1997).

A Figura 6 ilustra as curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da ET-1, ET-3, bem como dos agonistas seletivos de receptores ET_B, a SRTX e o IRL 1620, na VB isolada de coelho. Todos esses agonistas causaram contrações sustentadas e dependentes de concentração. Não foram observadas diferenças significativas entre as CK₅₀ ou as E_H da endotelina-1 e quaisquer dos outros agonistas endotelinérgicos testados (Tabela 3).

A incubação de tiras de VB isolada de coelho com o antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A, BQ-123 (3 μM; por 20 min), não afetou a CK₅₀ da ET-1 [2,9 nM (1,6-5,3)], mas inibiu as respostas induzidas por 30 e 100 nM de ET-3 em cerca de 35% (Figura 7). O antagonista não peptídico seletivo de receptores ET_A, A-127722-5 (0,1 e 0,3 μM), também não modificou a reatividade da VB [CK₅₀ 3,5 nM (1,1-11,2) e 2,1 nM (0,5-8,3), respectivamente] à ET-1 (Figura 7A). Foi impossível verificar a atividade antagonística de concentrações de A-127722-5 maiores que 0,3 μM, pois causavam contração da preparação (resultados não apresentados; n = 5). Por outro lado, o BQ-788 (antagonista peptídico seletivo de receptores ET_B; 0,3 ou 1 μM) inibiu de modo dependente da concentração as respostas induzidas por SRTX [CK₅₀ 6,8 nM (2,2-20,9) e 12,3 nM (6,0-25,1), respectivamente, sem alterar o seu efeito máximo (Figura 7C). A reatividade da VB de coelho ao carbacol não foi alterada por BQ-123 ou BQ-788 (Figura 7D).

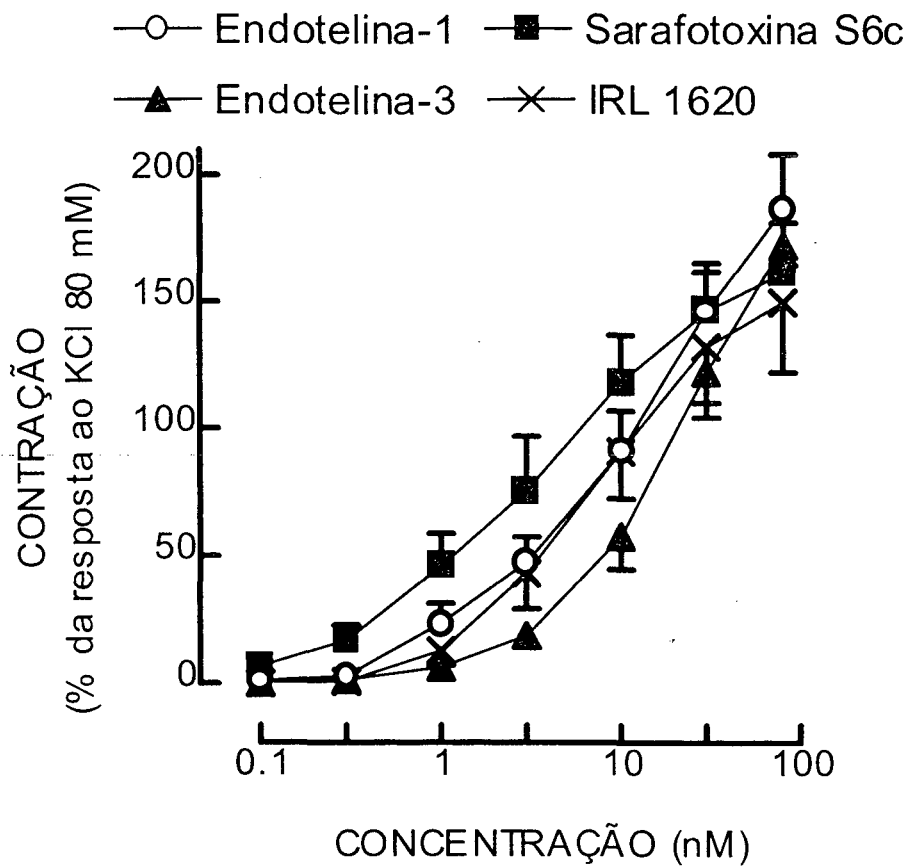


FIGURA 6 – Curvas concentração-efeito médias aos efeitos contráteis da endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e IRL 1620 na vesícula biliar isolada de coelho. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6 experimentos.

TABELA 3 - Respostas médias de tiras de vesícula biliar isolada de coelho a agonistas de receptores endotelinérgicos. Para fins de comparação, também são apresentados resultados análogos obtidos em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. As CK_{50} s são apresentadas como médias geométricas acompanhadas dos limites de confiança para 95%. Os E_H s dos agonistas estão expressos como a média \pm E. P. M., como porcentagens relativas à reatividade de cada preparação ao KCl 80 mM. O valor de “n” indica o número de experimentos. ^aContração induzida por 100 nM de agonista.

ANIMAL	AGONISTA	CK_{50} nM	E_H (%) ^a	n
Coelho	Endotelina-1	3,4 (1,2-9,3)	186 \pm 22	6
	Endotelina-3	8,4 (4,6-15,4)	172 \pm 7	6
	Sarafotoxina S6c	2,6 (0,8-2,8)	161 \pm 20	6
	IRL 1620	4,3 (1,7-11,1)	150 \pm 27	6
Cobaia ^b	Endotelina-1	0,8 (0,2-4,1)	129 \pm 10	6
	Endotelina-3	3,5 (2,4-5,2)	143 \pm 11	6
	Sarafotoxina S6c	1,5 (0,7-3,3)	103 \pm 6*	7
	IRL 1620	42,3 (14,4-123,9)*	65 \pm 9*	5

* $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente para endotelina-1, na mesma espécie. ^bResultados relatados por Cardozo *et al.* (1997).

A atividade das amostras dos antagonistas endotelinérgicos utilizados na VB de coelho foi confirmada em anéis de aorta torácica de coelho sem endotélio. A incubação desta preparação com BQ-123 (1 μM) ou A-127722-5 (0,3 μM), antagonistas seletivos de receptores do tipo ET_A , causou deslocamento significativo à direita da curva concentração-resposta à ET-1 (Figura 8A). Da mesma forma, o BQ-788 (1 μM), antagonista seletivo de receptores do tipo ET_B , inibiu significativamente a contração produzida pela SRTX (Figura 8B).

4.2. - Vesícula biliar isolada de cobaia

A incubação do tecido com INDO (5,6 μM), um inibidor não-seletivo de ciclooxygenases, resultou em reduções significativas das respostas da VB à ET-1, ET-3 e SRTX (Figura 9). Porém, convém salientar que a INDO causou redução menor do E_H da ET-1 (de 170 ± 13 para $123 \pm 9\%$ da resposta ao KCl 80 mM) do que da ET-3 (de 193 ± 23 para $99 \pm 18\%$) ou SRTX (de 108 ± 15 para $21 \pm 4\%$). Os mesmos resultados, vistos de outra forma, indicam que a INDO inibiu os E_H da ET-1, ET-3 e SRTX para frações correspondentes a 0,72; 0,51 e 0,19 das respostas controles originais, respectivamente.

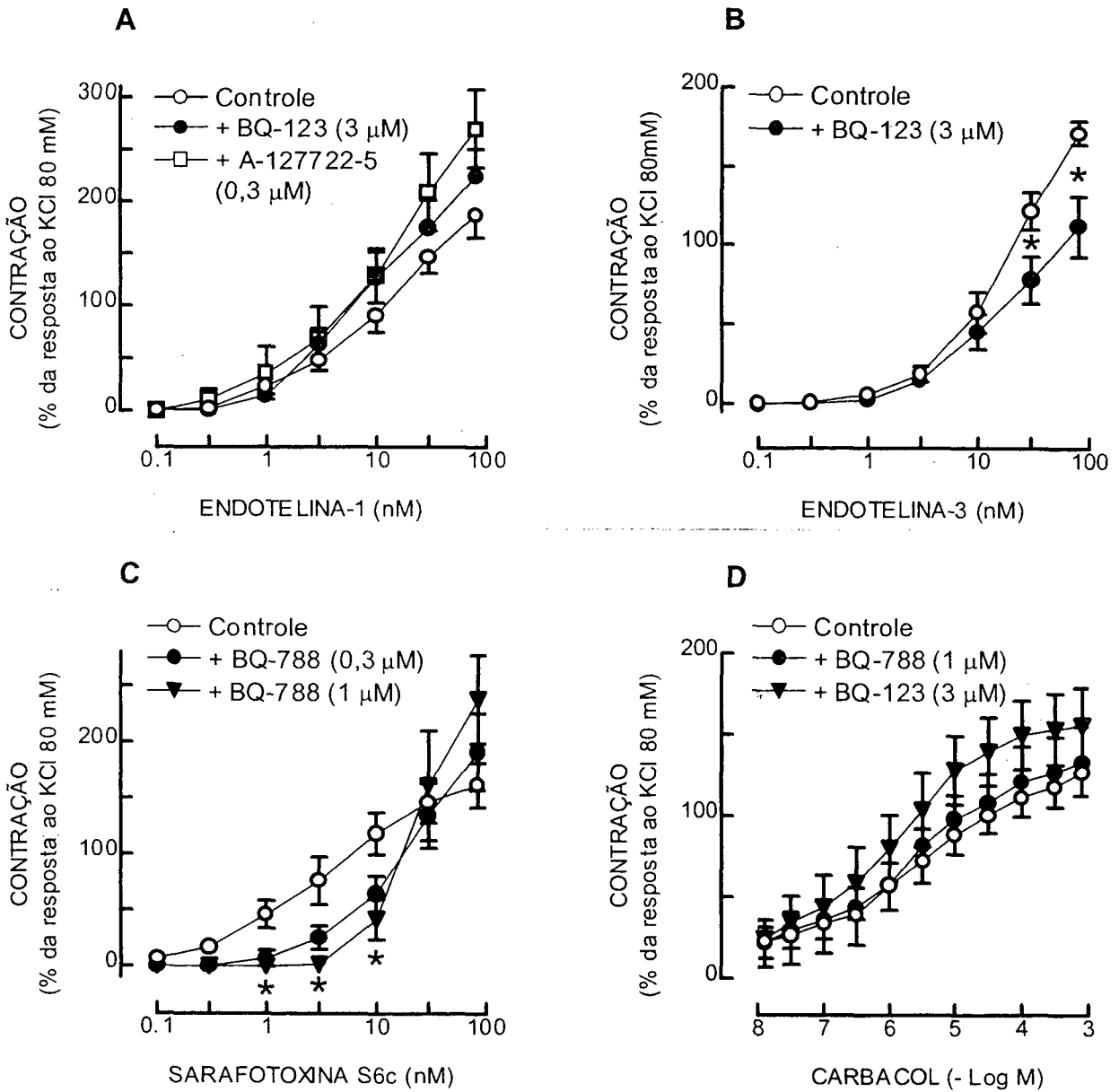


FIGURA 7 – Influência de antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET_A (BQ-123 ou A-127722-5) ou ET_B (BQ-788) sobre a contração induzida pela ET-1 (A), ET-3 (B), SRTX (C) ou carbachol (D) em tiras de vesícula biliar isolada de coelho. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5-6 experimentos e asteriscos denotam $P \leq 0,05$ quando comparados ao valor correspondente do grupo controle.

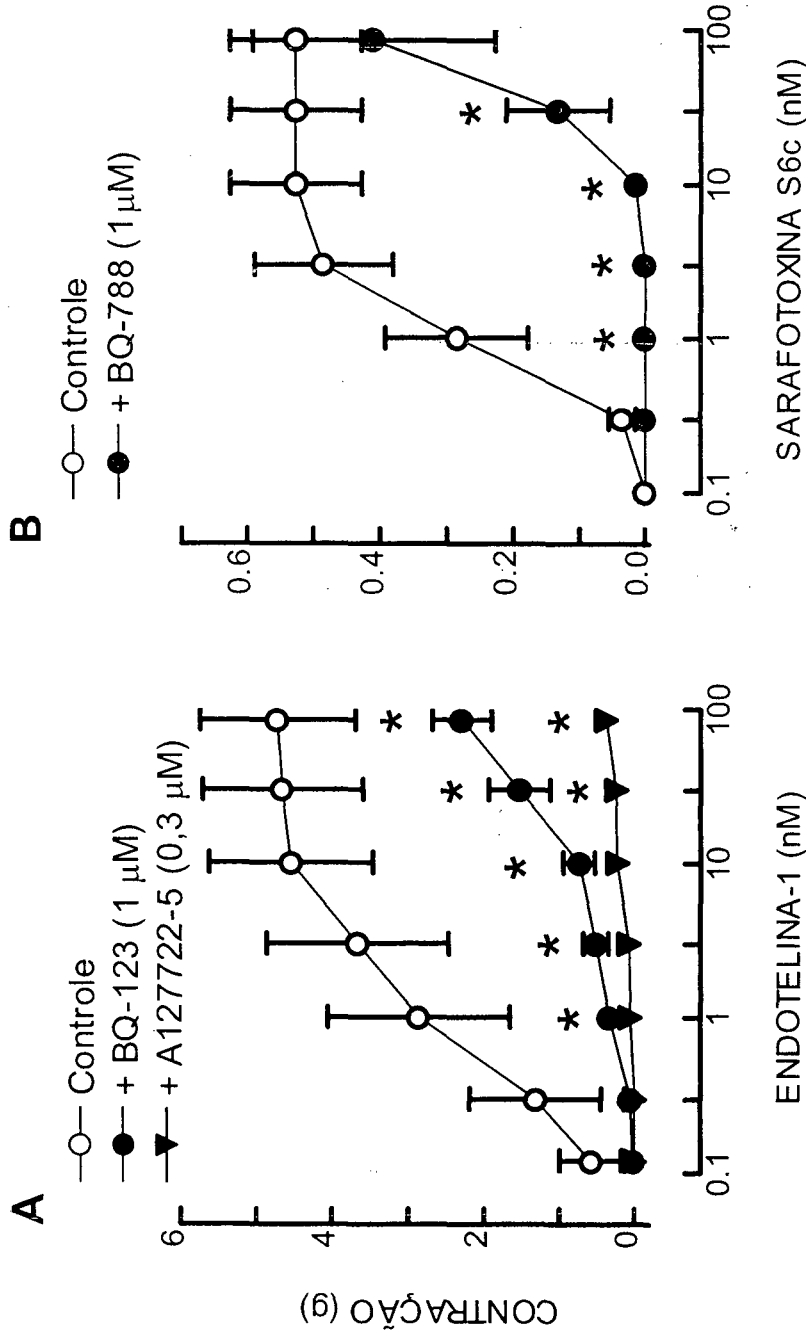


FIGURA 8 - Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos ET_A (BQ-123 ou A127722-5) ou ET_B (BQ-788) sobre os efeitos contráteis da ET-1 (A) e da SRTX (B) em anéis de aorta torácica de coelho sem endotélio. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste "t" bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de pelo menos 4 experimentos e asteriscos denotam $P \leq 0,05$ quando o valor é comparado ao valor correspondente do grupo controle.

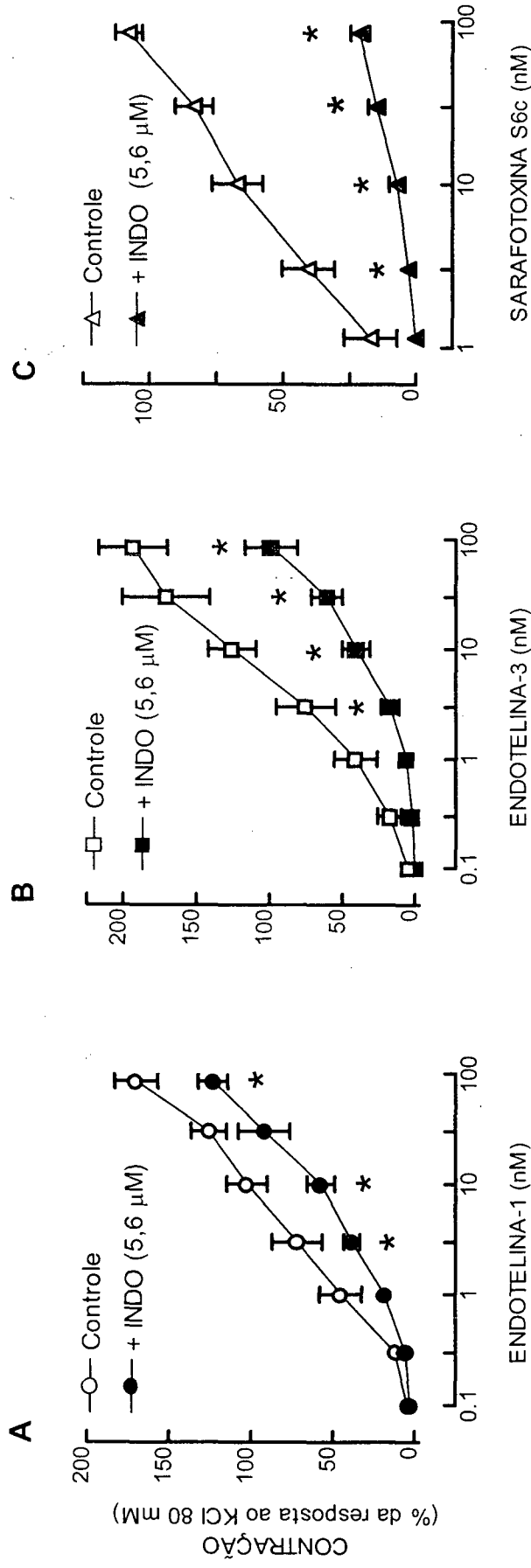


FIGURA 9 - Influência da indometacina (INDO; 5,6 μ M) nas contrações induzidas pela ET-1 (A), ET-3 (B) e SRTX (C) na vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de 5-6 experimentos e asteriscos denotam $P \leq 0,05$ quando comparados ao valor correspondente do grupo controle.

Na tentativa de evidenciar se a ET-1 causa liberação diferencial de prostanoídes pela ativação de receptores ET_A e ET_B, foram realizados experimentos funcionais na presença de um antagonista de um ou outro tipo de receptor. Porém, experimentos demonstrando que a incubação de tiras de VB isolada de cobaia com o BQ-123 ou BQ-788, ambos a 1 μ M e por 20 min, não alterou a curva concentração-efeito à ET-1 (resultados não apresentados; n = 6) inviabilizaram a utilização deste agonista para testar essa hipótese. No entanto, quando substituiu-se a ET-1 por ET-3, que também ativa ambos os tipos de receptores endotelinérgicos, verificou-se que tanto o BQ-123, quanto o BQ-788, reduziram significativamente e de modo dependente de concentração as respostas contráteis à ET-3 (Figura 10).

Quando adicionou-se INDO a preparações incubadas previamente com BQ-123 (i.e. com os receptores do tipo ET_A bloqueados), o inibidor de ciclooxigenase quase que aboliu as contrações induzidas por ET-3 (Fig. 10A). Ao contrário, quando os receptores ET_B foram bloqueados com o BQ-788, as contrações induzidas pela ET-3 foram significativamente aumentadas pela adição de INDO (Fig. 10B). A Figura 11 ilustra mais claramente os efeitos diferenciais da INDO sobre as contrações induzidas por 30 nM de ET-3 na presença de BQ-123 ou BQ-788. Nenhum dos antagonistas afetou as contrações causadas por carbacol (resultados não apresentados; n = 5-6 em cada caso).

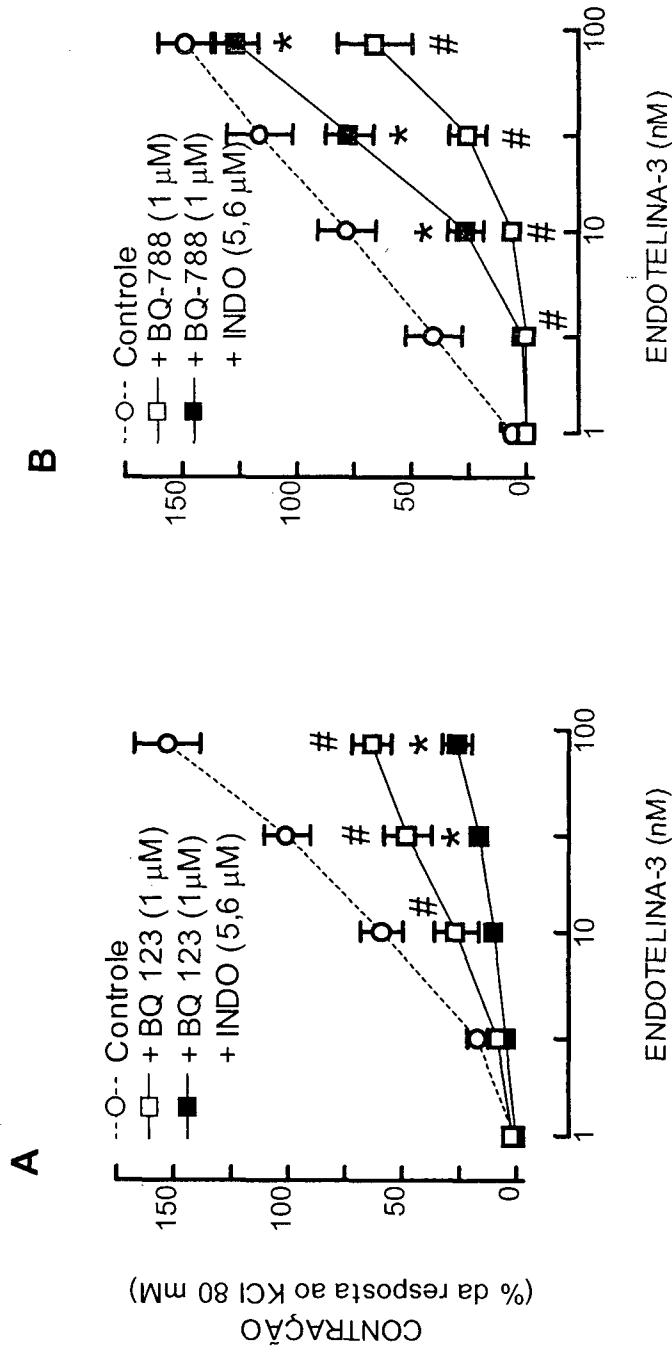


FIGURA 10 - Influência da indometacina (INDO; 5,6 μM) nas contrações da vesícula biliar isolada de cobaia induzidas pela ET-3 na ausência (controle) ou presença de BQ-123 (A) ou BQ-788 (B). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média ± E. P. M. de 7 experimentos. #P ≤ 0,05 e *P ≤ 0,05, quando comparados ao valor correspondente do grupo controle ou na presença do antagonista sozinho, respectivamente.

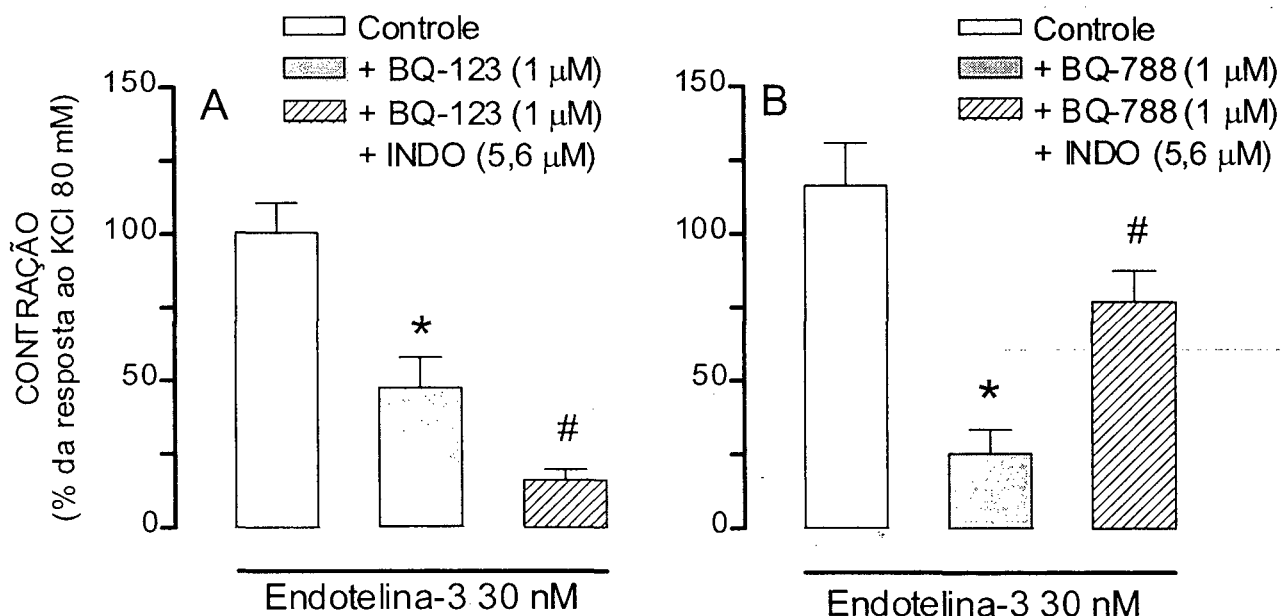


FIGURA 11 - Influência da indometacina (INDO; 5,6 μ M) na contração da vesícula biliar isolada de cobaia induzida pela ET-3 (30 nM) na ausência (controle) ou presença de BQ-123 (**A**) ou BQ-788 (**B**). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste "t" bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de 7 experimentos. # $P \leq 0,05$ e * $P \leq 0,05$, quando comparados ao valor correspondente do grupo controle ou na presença do antagonista sozinho, respectivamente.

Diante das evidências funcionais de que cada subtipo de receptor endotelinérgico estaria acoplado diferencialmente à produção de prostanóides, procuramos confirmar a habilidade das ETs em estimular a síntese de prostanóides na VB de cobaia. Além disso, fomos investigar qual era a relação entre síntese de prostanóides, contração e alterações na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela ET-1 (um agonista não seletivo ou dual de receptores ET_A/ET_B) e a SRTX (um agonista seletivo de receptores ET_B ; Masaki *et al.*, 1994).

Experimentos utilizando radioimunoensaio demonstraram que a ET-1 (100 nM) causou liberação gradativa dependente do tempo de 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$, metabólito estável da PGI $_2$, de tiras de VB de cobaia (Figura 12). A quantidade de 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$, liberada pela preparação para o meio de incubação em resposta à ET-1 atingiu níveis significativamente maiores que os basais a partir dos 16 min de exposição, e essa resposta estabilizou-se a partir de 20 a 30 min. A liberação de 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$ induzida por 100 nM de ET-1 foi fortemente bloqueada por incubação prévia de INDO (5,6 μ M; Figura 13). Em preparações não expostas à ET-1, a inibição da liberação de 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$ também foi significativamente inibida pela INDO.

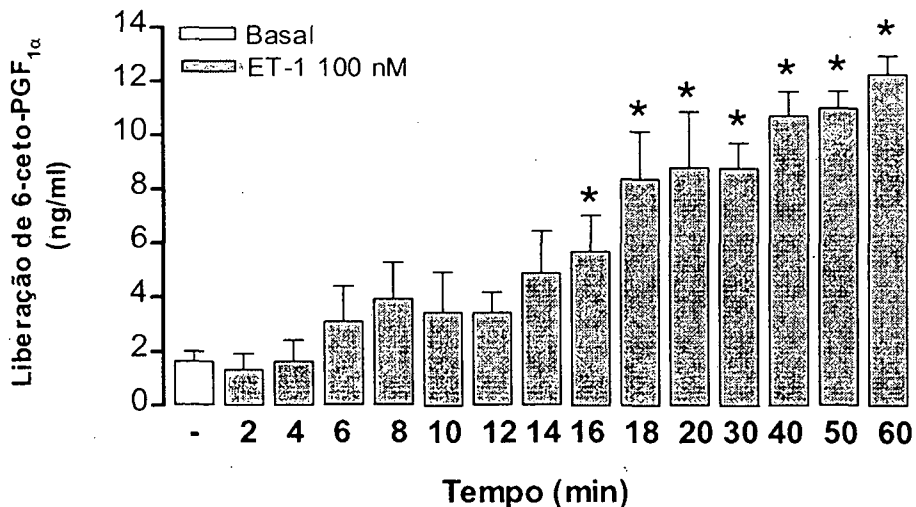


FIGURA 12 – Liberação de 6-ceto-PGF_{1α} induzida pela ET-1 (100 nM) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 7 experimentos e asteriscos denotam P ≤ 0,05 quando comparados ao valor basal.

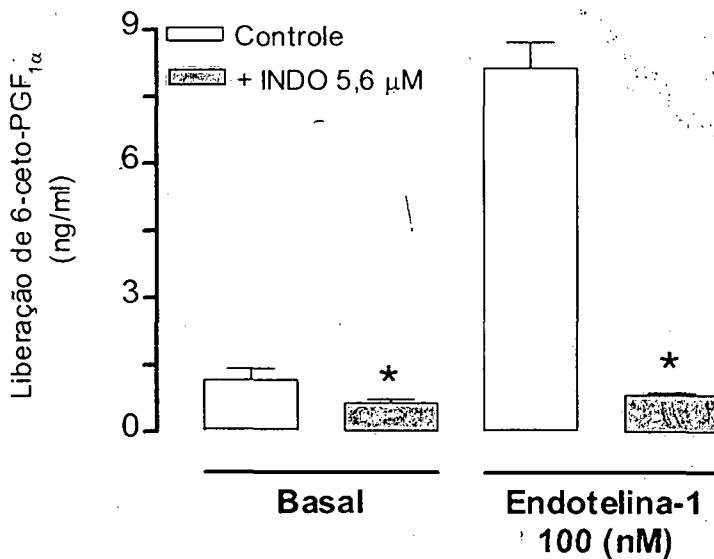


FIGURA 13 – Influência da indometacina (INDO; 5,6 μM) sobre a liberação de 6-ceto-PGF_{1α} basal ou induzida pela ET-1 (100 nM), num período de 20 min, em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 4-10 experimentos e asterisco denota P < 0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo controle.

A adição cumulativa de concentrações crescentes de ET-1 causou liberação significativa e dependente da dose de 6-ceto-PGF_{1α}. As concentrações de 1, 10 e 100 nM de ET-1 aumentaram, num período de 20 min, a liberação deste prostanóide de um valor basal de $1,7 \pm 0,2$ ng/ml, para $4,7 \pm 0,4$; $5,6 \pm 0,4$ e $8,2 \pm 0,6$ ng/ml, respectivamente (Figura 14A). Embora a ET-3 e a SRTX também tenham estimulado a liberação de 6-ceto-PGF_{1α}, ambos causaram efeitos menores que os da ET-1, em todas as concentrações testadas. Neste sentido, a exposição à ET-3 ou à SRTX (cada qual a 100 nM) aumentou a liberação do metabólito estável da PGI₂ de $1,1 \pm 0,2$ para $4,0 \pm 0,6$ ng/ml e de $1,7 \pm 0,3$ para $4,7 \pm 0,8$ ng/ml, respectivamente (Figuras 14B e 14C). Conforme ilustra a Figura 15, a ET-1 também induziu uma liberação muito discreta de TXB₂, o metabólito estável de TXA₂, mas tal efeito só foi significativo na concentração de 100 nM (de um basal de $0,8 \pm 0,1$ para $1,4 \pm 0,2$ ng/ml).

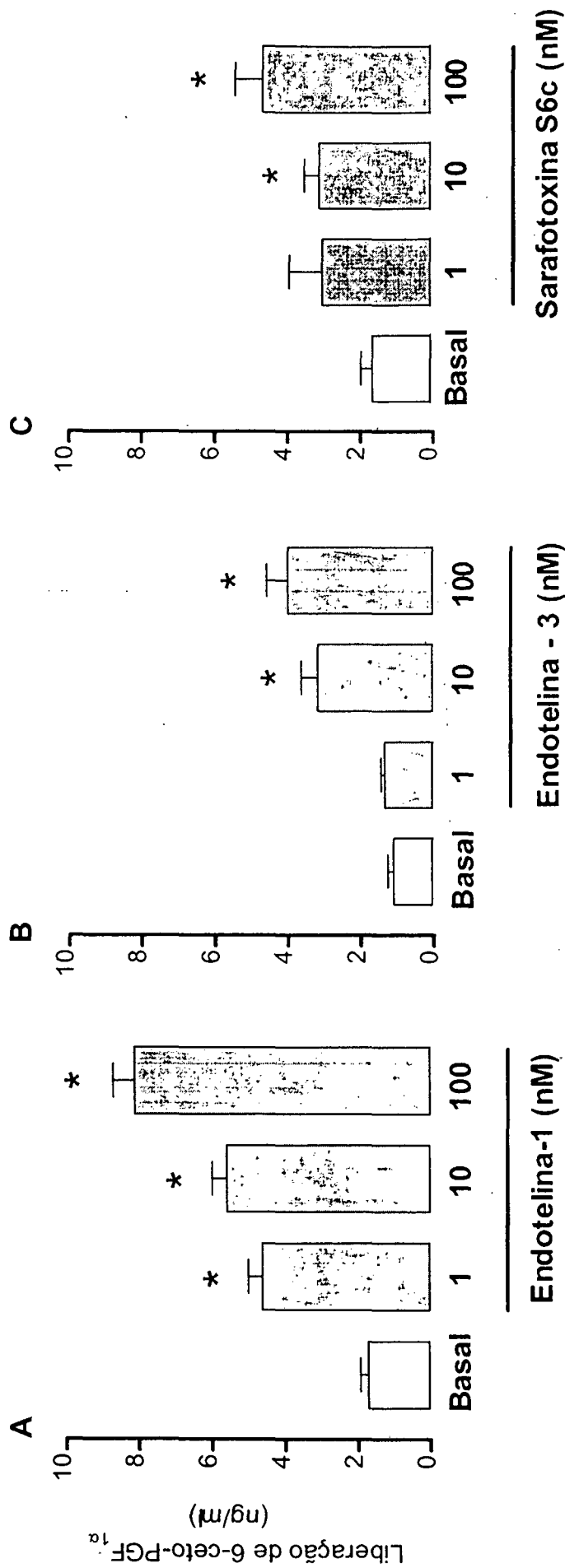


FIGURA 14 – Liberação de 6-ceto-PGF_{1α} induzida por adições cumulativas de concentrações crescentes de ET-1 (A), ET-3 (B) e SRTX (C), nas concentrações indicadas, em segmentos de vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 7-10 experimentos e asteriscos denotam $P \leq 0,05$ quando comparados ao grupo basal.

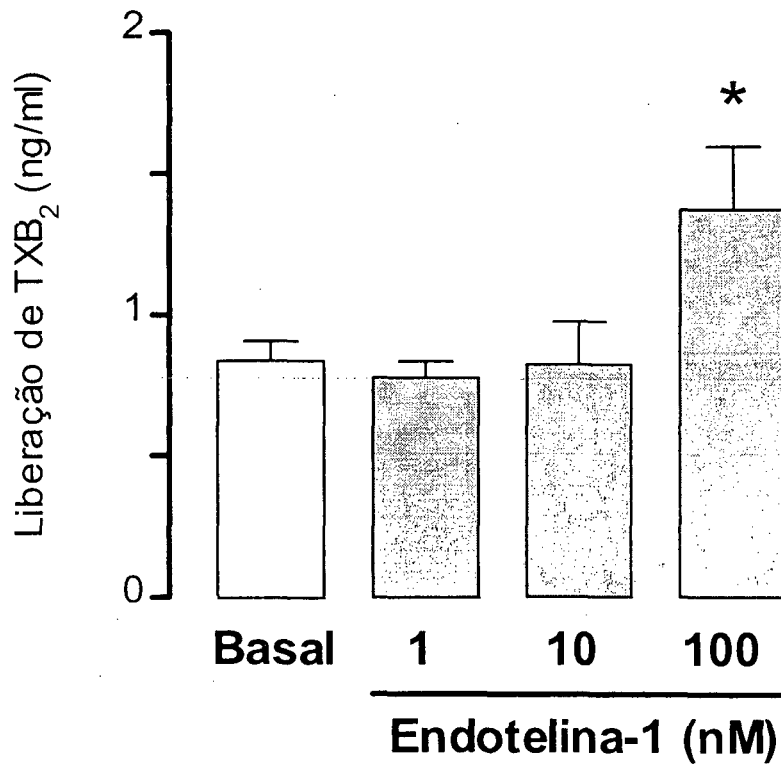


FIGURA 15 – Liberação de TXB₂ induzida por adições cumulativas de concentrações crescentes de ET-1, incubadas durante 20 min nas concentrações indicadas, em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 10 experimentos e asterisco denota $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo basal.

Outra série de experimentos foi realizada com o propósito de determinar até que ponto as contrações mediadas através de receptores ET_A e/ou ET_B estariam correlacionadas a alterações na $[Ca^{2+}]_i$. Além disso, foi também avaliada a influência de prostanóides na mediação desses eventos. Nesse sentido, a adição de concentrações cumulativas e crescentes de ET-1 (1, 10 e 100 nM) causou contração tônica gradativa da VB isolada de cobaia, acompanhada de um aumento simultâneo, também gradativo, da $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 16). A alteração da $[Ca^{2+}]_i$ induzida por este peptídeo foi caracterizada por uma resposta monofásica, e a exemplo do que foi observado com o desenvolvimento das contrações, também exibiu um decurso temporal bastante lento.

A Figura 17 ilustra que, de maneira semelhante à ET-1, a SRTX também causou contração tônica gradativa da preparação, acompanhada de um aumento simultâneo, também gradativo, da $[Ca^{2+}]_i$, nas concentrações de 1, 10 e 100 nM. Os efeitos contráteis induzidos por estes dois agonistas foram semelhantes (Figura 17A). No entanto, o aumento simultâneo da $[Ca^{2+}]_i$ causado pela SRTX nas concentrações de 1 e 10 nM foi significativamente maior quando comparado à ET-1 nestas mesmas concentrações (Figura 17B).

A incubação prévia da preparação com INDO (5,6 μ M) resultou em uma redução do E_H da ET-1, de 560 ± 100 para 230 ± 70 mg de contração (Figura 18A). Por outro lado, a INDO não modificou os aumentos

simultâneos da $[Ca^{2+}]_i$ causados pela ET-1 nessas mesmas preparações (Figura 18B). Já com relação à SRTX, observou-se que a INDO reduziu, significativamente, tanto as respostas contráteis (E_H reduzido de 460 ± 100 para 160 ± 40 mg), quanto os aumentos simultâneos da $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 19). Quanto a esta última ação da SRTX, por exemplo, a porcentagem de aumento da razão da intensidade de fluorescência do Ca^{2+} induzido por 100 nM do agonista seletivo de receptores ET_B foi reduzido pela INDO de $7,7 \pm 0,7$ para $4,0 \pm 0,4$.

As análises de regressão linear revelaram que as alterações na tensão e na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pela ET-1 e SRTX estão fortemente correlacionadas (Figura 20). A INDO diminuiu significativamente a inclinação da reta de regressão linear para a ET-1 que correlaciona ambos estes parâmetros, ao inibir seletivamente o efeito contrátil deste peptídeo, sem alterar o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 20A). Por outro lado, ambas as alterações induzidas pela SRTX foram inibidas igualmente pela INDO, de modo que a inclinação da reta de regressão linear que correlaciona os dois efeitos do agonista permaneceu inalterada (Figura 20B).

Por fim, conforme ilustrado na Figura 21, a adição de ionomicina ($10\mu M$), um ionóforo de cálcio, após a exposição da preparação a 100 nM de ET-1 não causou nenhum incremento da resposta contrátil ou da porcentagem de aumento da F340/F380 induzido pelo peptídeo. No

entanto, a adição subsequente de EGTA (20 mM), um quelante de Ca^{2+} , ainda na presença tanto de ET-1 quanto de ionomicina, causou redução significativa da contração induzida pela ET-1, sem alterar a porcentagem de aumento da razão da intensidade de fluorescência do Ca^{2+} .

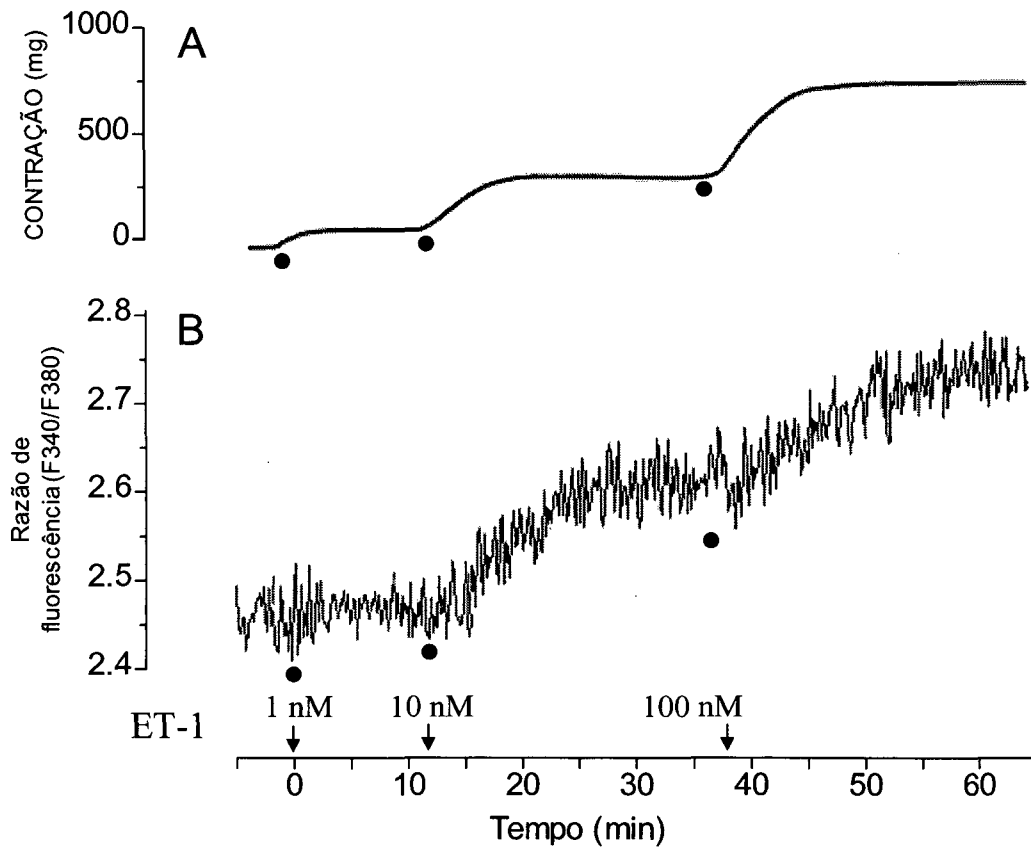


FIGURA 16 – Registro típico demonstrando contração (A) e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular (B) induzidos pela endotelina-1 (1, 10 e 100 nM) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Resultados semelhantes foram obtidos em outros 4 experimentos.

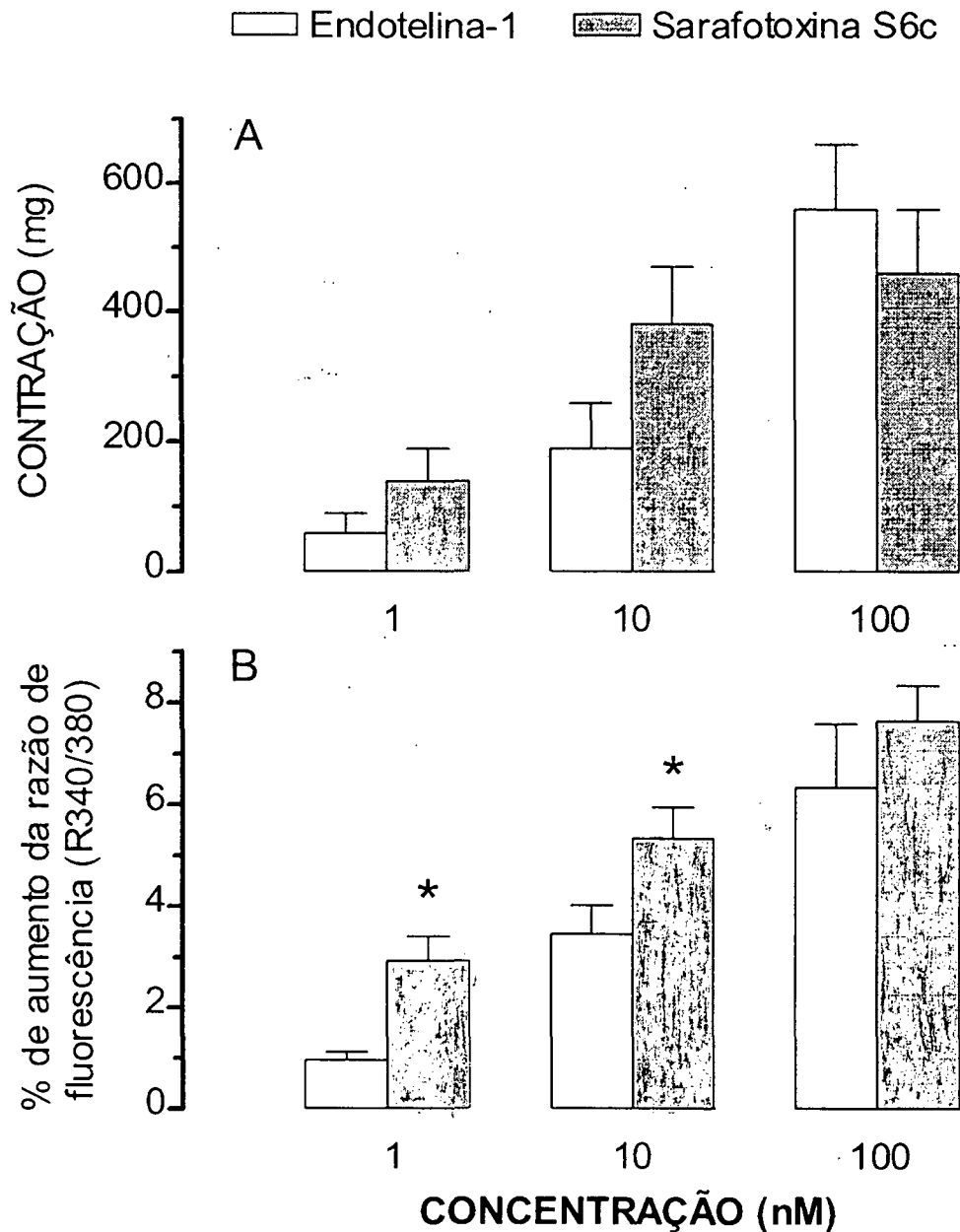


FIGURA 17 – Contração (A) e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular (B) induzidos pela endotelina-1 e sarafotoxina S6c em tiras de vesícula biliar isolada de cobraia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5-7 experimentos e asterisco denota $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente da endotelina-1.

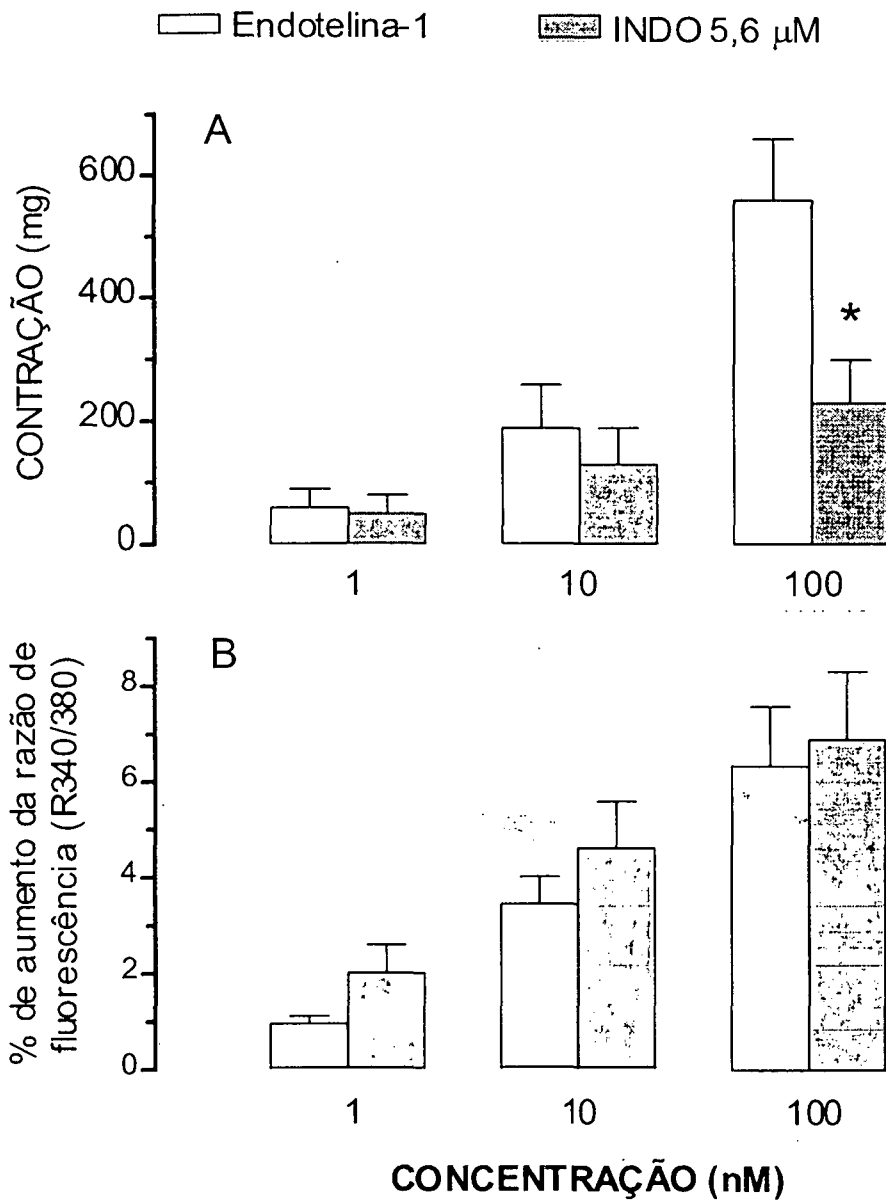


FIGURA 18 – Influência da indometacina (INDO; 5,6 μ M) sobre a contração (A) e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular (B) induzido pela ET-1 em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 3-5 experimentos e asterisco denota $P \leq 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo controle.

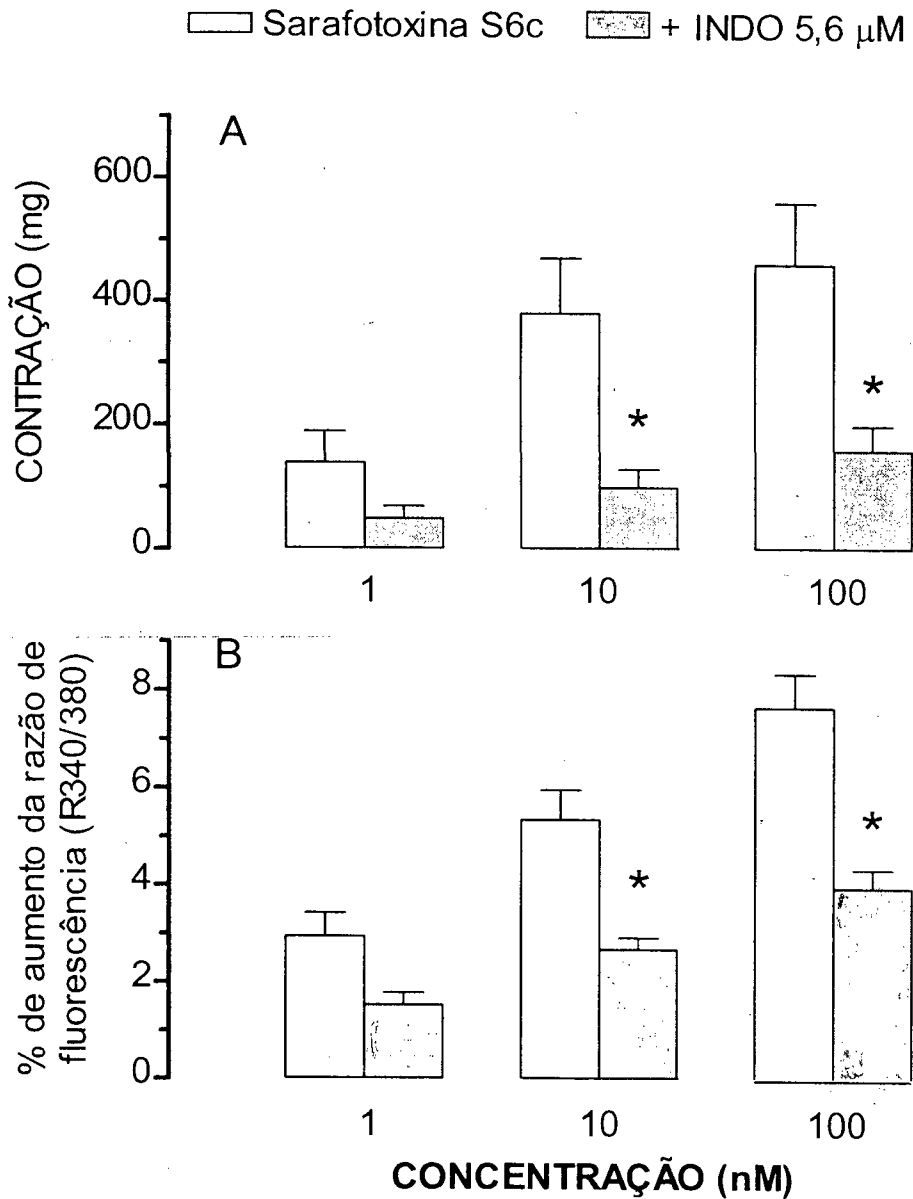


FIGURA 19 – Influência da indometacina (INDO; 5,6 μ M) sobre a contração (A) e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular (B) induzido pela SRTX em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 4-7 experimentos e asterisco denota $P \leq 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo controle.

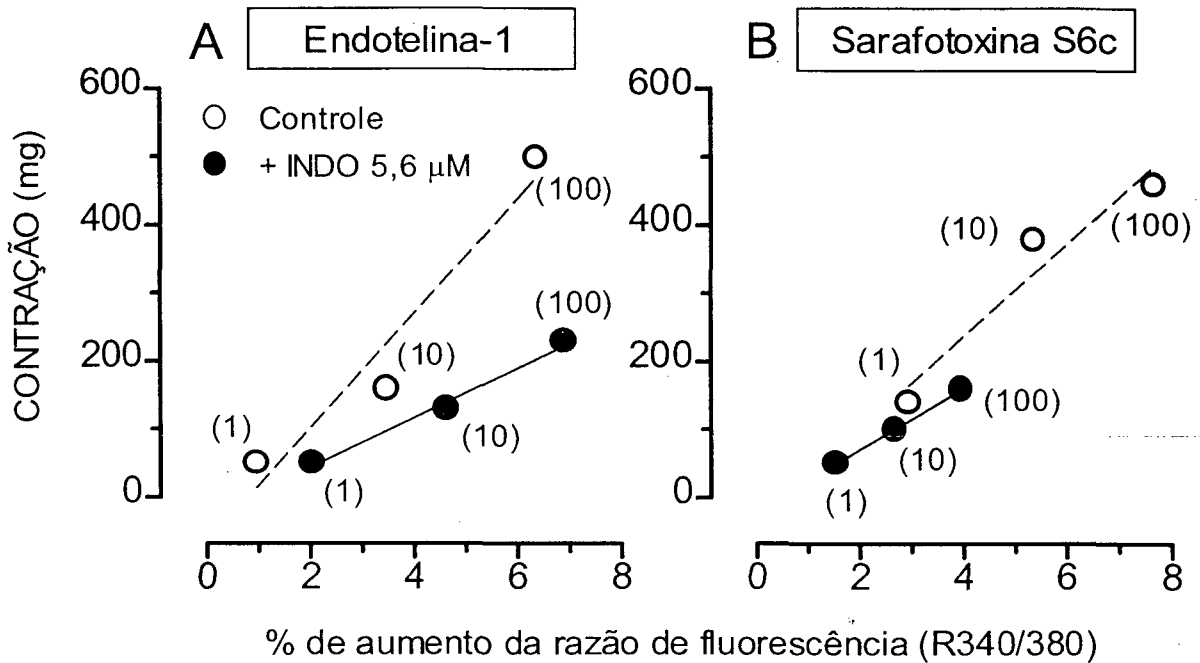


FIGURA 20 – Análise de regressão linear entre as alterações na contração e no aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular induzido pela endotelina-1 (**A**) e sarafotoxina S6c (**B**), na ausência e na presença de indometacina (INDO; 5,6 μM), em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Cada valor representa a média obtida com cada agonista nas concentrações indicadas nos parênteses.

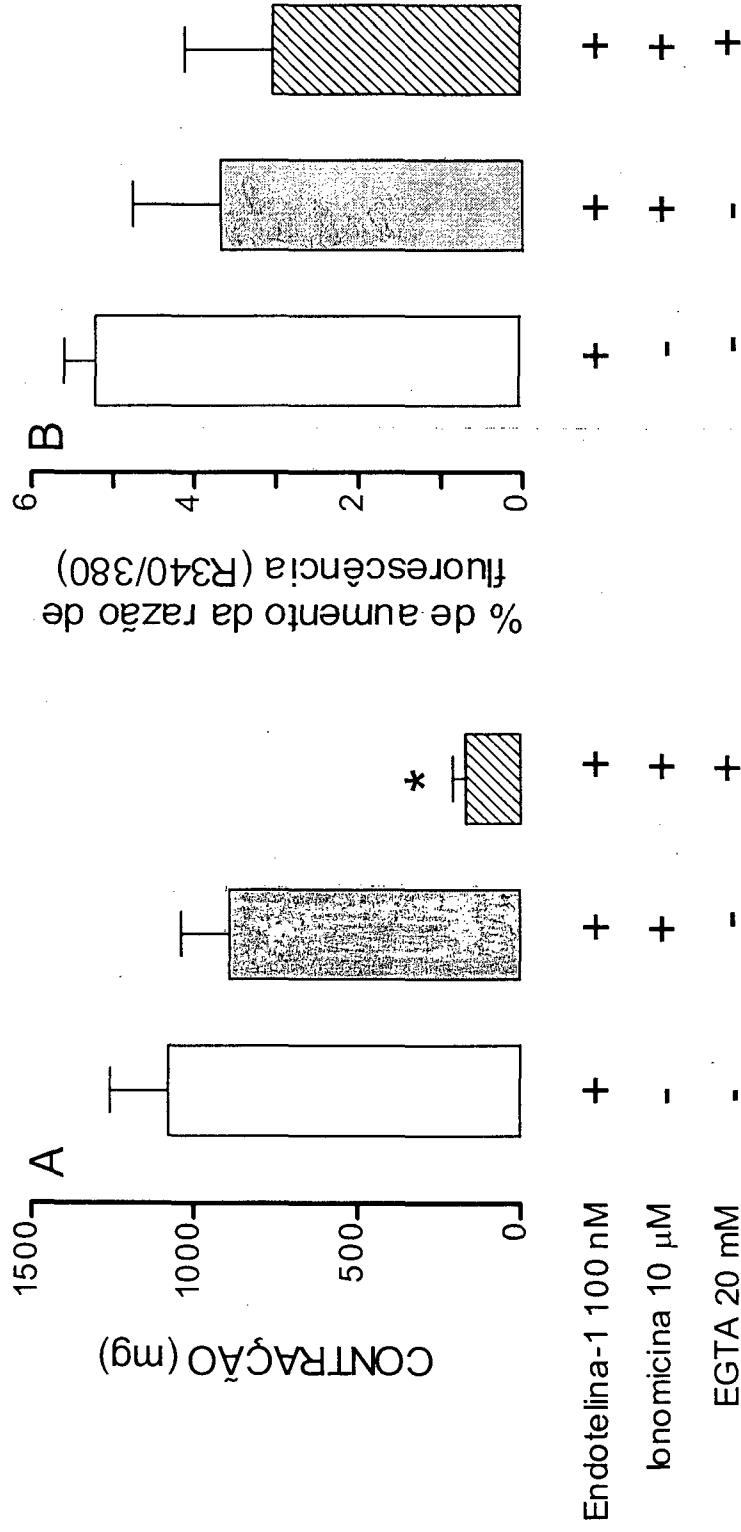


FIGURA 21 – Influência da ionomicina (10 μ M) e da associação de ionomicina mais EGTA (20 mM) sobre a contração (A) e o aumento simultâneo da concentração de Ca^{2+} intracelular (B) induzido pela endotelina-1 (100 nM) em tiras de vesícula biliar isolada de cobaia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste “t” bicaudal de Student para amostras não-pareadas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5 experimentos e asterisco denota $P \leq 0,05$ quando comparado ao valor da endotelina-1.

5. DISCUSSÃO

5.1. - Efeitos da endotelina-1 e de outros agonistas na vesícula biliar isolada de coelho

A exemplo do que ocorre na VB de cobaia (Cardozo, 1996; Cardozo *et al.*, 1997), evidenciamos que a ET-1 também é um potente agonista contrátil da VB isolada de coelho. Comparada à atividade de outros agonistas contráteis testados nessa preparação, a ET-1 foi 40 vezes menos potente do que a CCK-8, e 103 e 23 vezes mais potente do que o carbacol e serotonina, se considerarmos a CK_{50} , respectivamente. A VB de coelho apresentou contrações lentas e sustentadas em resposta à ET-1, que foram dependentes da concentração e resistentes a sucessivas renovações da solução nutriente. Ao contrário da ET-1, os demais agonistas induziram contrações muito mais rápidas da preparação, embora também fossem respostas sustentadas, e seus efeitos foram revertidos rapidamente após a lavagem. Coletivamente, esses resultados foram bastante semelhantes aos obtidos com a VB de cobaia, apesar de termos constatado que a ET-1 foi equipotente a CCK-8, e 109 e 412 mais potente que o carbacol e a histamina em contrair a preparação desta última espécie, respectivamente (Cardozo 1996). Também é interessante salientar que, diferentemente da VB de cobaia, a VB de coelho parece ser insensível aos efeitos contráteis da histamina.

A dificuldade em reverter as respostas contráteis induzidas pela ET-1 na VB, em ambas as espécies, poderia ser explicada pela altíssima afinidade

dos receptores endotelinérgicos por esse agonista, que faz com que sua ligação aos receptores seja essencialmente irreversível (Hochoer *et al.*, 1992; Watakabe *et al.*, 1992; Wu-Wong *et al.*, 1993). Chiou e colaboradores (1997), utilizando receptores ET_B obtidos de pulmão humano e expressos em células de ovário de hamster chinês, confirmaram esses achados e demonstraram que a ligação de ETs naturais, tais como ET-1 e ET-3, a esses receptores exibem características de irreversibilidade, enquanto que a ligação de agonistas sintéticos truncados, como o IRL 1620 apresentam reversibilidade muito mais pronunciada. Esses dados da literatura alinham-se às nossas observações anteriores de que as respostas contráteis da VB de coelho e de cobaia (Cardozo *et al.*, 1997) ao IRL 1620 eram mais facilmente revertidas quando comparadas àquelas induzidas pela ET-1, ET-2 (testado só em cobaia) ou ET-3. No entanto, na VB de ambas as espécies, as contrações induzidas por SRTX, que apresenta forte homologia estrutural com as 3 isoformas de ET, também mostram-se mais prontamente reversíveis que aquelas causadas por esta última. Tal fato poderia sugerir que os perfis distintos das repostas a ambos os peptídeos esteja relacionada à ativação simultânea de receptores ET_A e ET_B pelas ETs.

Quando comparada à VB de cobaia (Cardozo *et al.*, 1997), a VB de coelho foi 4 e 2 vezes menos reativa, se considerarmos a CK₅₀, à ET-1 e ET-3, respectivamente. Apresentou reatividade semelhante para a SRTX e

foi cerca de 10 vezes mais responsiva ao IRL 1620. Além disso, ao contrário do que foi observado na VB de cobaia, onde os dois agonistas seletivos de receptores ET_B induziram E_H (i.e efeito da maior concentração testada – 100 nM) menores do que o da ET-1, tanto a SRTX como o IRL 1620 foram equiefetivos à ET-1 em contrair a VB de coelho. Esses resultados sugerem que a VB de coelho talvez apresente uma proporção maior de receptores ET_B funcionais do que a de cobaia, embora tal hipótese ainda precise ser confirmada por estudos complementares de ligação de radioligantes seletivos para receptores endotelinérgicos ET_A e ET_B .

5.2. - Influência de antagonistas endotelinérgicos sobre contrações da vesícula biliar isolada de coelho induzidas por ET-1, ET-3 e SRTX

Numa segunda abordagem visando a caracterização dos receptores endotelinérgicos da VB de coelho, avaliou-se os perfis de ação de agonistas na presença de diferentes antagonistas. Para isso, utilizamos os seguintes antagonistas: BQ-123 e A-127722-5, antagonistas peptídico e não peptídico, respectivamente, seletivos de receptores do tipo ET_A (Ihara *et al.*, 1992; Opgenorth *et al.*, 1996) e o BQ-788, antagonista peptídico seletivo de receptores ET_B (Ishikawa *et al.*, 1994).

Para testar a hipótese da predominância de receptores ET_B e verificar se a VB de coelho também apresenta receptores ET_A , testamos a susceptibilidade das contrações induzidas pela ET-1 ou ET-3 à inibição por

A-127722-5 e/ou BQ-123. Nesse sentido, constatamos que nenhum dos dois antagonistas afetaram a curva concentração-efeito à ET-1 e que o BQ-123 causou apenas uma modesta redução das contrações induzidas por concentrações mais elevadas de ET-3 (30 e 100 nM). Nas concentrações testadas, ambas as drogas antagonizaram, de modo pronunciado, o efeito constritor da ET-1 na aorta torácica de coelho, aumentando a CE_{50} do agonista em mais de 100 vezes. Esses resultados sugerem que a VB de coelho contém uma população discreta de receptores ET_A , reforçando a nossa hipótese da predominância de receptores ET_B . Além disso, a exemplo do que foi observado na VB de cobaia (Battistini *et al.*, 1994; Cardozo *et al.*, 1997), esses receptores ET_A são praticamente insensíveis ao bloqueio por antagonistas seletivos. Um achado bastante inesperado foi o fato de que o BQ-788 causou apenas um antagonismo muito discreto das contrações induzidas pela SRTX na VB de coelho, em concentrações suficientes para antagonizar substancialmente o efeito contrátil desse agonista em anéis de aorta dessa mesma espécie. Infelizmente, não foi possível utilizarmos concentrações mais altas dos três antagonistas pois, nessas condições, todos causaram contrações da VB de coelho. Os mecanismos pelos quais estes antagonistas induzem contração não estão esclarecidos, porém este achado pode ser relevante se considerarmos a possibilidade de incidência de efeito adverso no trato biliar caso venham a

ser utilizados na clínica, principalmente se os mesmos forem excretados (e concentrados) por esta via.

Vários estudos têm demonstrado que as ETs causam contração da musculatura lisa gastrintestinal através da interação com receptores ET_A e/ou ET_B, dependendo do tecido e da espécie. Somente os receptores ET_B, por exemplo, medeiam a contração induzida pelas ETs no estômago isolado de rato (Allcock *et al.*, 1995). Por outro lado, as células do músculo liso gástrico de cobaia contêm ambos os receptores endotelinérgicos, porém apenas a estimulação dos receptores ET_A resulta em contração dessa preparação (Kitsukawa *et al.*, 1994). Além disso, verificou-se que a ET-1 interage com os dois receptores ET_A e ET_B causando contração da porção *muscularis* da mucosa do esôfago, do íleo e da VB de cobaia e da VB humana (Uchida *et al.*, 1998; Miasiro *et al.*, 1995; Cardozo *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001). Convém mencionar que, em relação à VB, Huang e colaboradores (2001) confirmaram, através do emprego de radioligantes, a nossa hipótese baseada em estudos funcionais, de que a contração induzida pela ET-1 na VB de cobaia é mediada por uma cooperação entre os receptores ET_A e ET_B presentes nesta preparação. Interessantemente, também evidenciaram que este perfil observado em cobaia assemelha-se bastante ao que ocorre na VB humana. Quanto à VB de coelho, grande parte dos receptores responsáveis pela contração induzida pelas ETs nesse tecido parecem ser do subtipo ET_B.

Porém, o fato de o BQ-123 ter reduzido, ainda que discretamente, as contrações induzidas por concentrações elevadas de ET-3 sugere que a preparação também expresse uma população modesta de receptores ET_A. Investigações adicionais são necessárias para elucidar estes resultados funcionais preliminares.

A teoria clássica de antagonismo competitivo, proposta por Schild (1949), postula que um antagonista que atue num único receptor, reduz igualmente a afinidade do receptor a todos os agonistas que interagem com esse receptor. No entanto, atualmente, diversas evidências contestam essa teoria, demonstrando que os antagonistas interagem com domínios do receptor que são distintos daqueles envolvidos na associação de agonistas, seja em relação a receptores endotelinérgicos (Sakamoto *et al.*, 1993) ou a outros integrantes da superfamília de receptores acoplados a proteínas G (Lee *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 1993; Beinborn *et al.*, 1993; Hall, 1992). Além disso, foi verificado que agonistas distintos de um mesmo receptor podem ligar-se, em graus variáveis, com diferentes domínios desse receptor (Gether *et al.*, 1993). Esses achados talvez possam explicar porque o BQ-123 afeta as respostas à ET-3, mas não à ET-1, nessa preparação. No entanto, não explicam porque o A-127722-5, BQ-123 e BQ-788 bloqueiam de modo muito mais pronunciado os receptores ET_A e ET_B da aorta do que os da VB de coelho (ou da cobaia, Cardozo *et al.*, 1997).

Várias hipóteses podem ser aventadas para tentar explicar a dificuldade dos antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos em bloquear os receptores de ETs presentes na VB de coelho, bem como na VB de cobaia. Uma delas seria a existência de múltiplos subtipos de receptores ET_A e ET_B. No entanto, é no mínimo intrigante que, de acordo com alguns autores, um determinado tecido possa expressar, simultaneamente, receptores ET_{A1}, ET_{A2}, ET_{B1} e ET_{B2} funcionais, todos mediando contração do músculo liso (Sudjarwo *et al.*, 1994; Yoneyama *et al.*, 1995; Nishiyama *et al.*, 1995). Além disso, é bastante difícil aceitar esta proposta que se baseia em evidências funcionais, uma vez que a biologia molecular identificou somente dois genes codificando os receptores para as ETs em mamíferos. Apesar disso não podemos esquecer a possibilidade de que um único gene possa gerar fitas de RNA alternativas, originando receptores que, apesar de compartilharem grande homologia com o receptor original, apresentam seqüências de aminoácidos diferentes (Shyamala *et al.*, 1994; Elshourbagy *et al.*, 1996; Miyamoto *et al.*, 1996).

Alternativamente, há outras explicações possíveis para a sensibilidade diferencial de um mesmo tipo de receptor à ativação por agonistas ou bloqueio por antagonistas competitivos. A determinação do seqüenciamento dos aminoácidos que compõem os receptores ET_A e ET_B possibilitou prognosticar que ambos os receptores eram alvos em potencial para sofrerem

modificações pós-translacionais. De um modo geral, essas modificações, tais como, palmitoilação, fosforilação e glicosilação desempenham papéis importantes na regulação funcional dos receptores acoplados à proteína G. A palmitoilação, por exemplo, está relacionada à expressão do receptor na superfície da célula, internalização, ligação do ligante e ativação da proteína G (para revisão ver Morello e Bouvier, 1996; Böhm *et al.*, 1997). A fosforilação de resíduos de serina e treonina parece ser um mecanismo importante de dessensibilização (Böhm *et al.*, 1997), enquanto que a glicosilação está envolvida também com ligação de ligantes e expressão do receptor na superfície da célula (Van Koppen e Nathanson, 1990; Kaushal *et al.*, 1994; Fukushima *et al.*, 1995). Sítios de palmitoilação e fosforilação foram detectados na porção carbóxi terminal citoplasmática dos receptores ET_A e ET_B (Horstmeyer *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1997; Roos *et al.*, 1998), bem como locais para glicosilação na porção amino terminal extracelular desses receptores (Shraga-Levine e Sokolovsky, 1998). A importância da glicosilação no que se refere à ligação do agonista está relativamente bem estabelecida (Hashido *et al.*, 1992; Shraga-Levine e Sokolovsky, 1998). No entanto, até o momento, temos apenas informações limitadas sobre até que ponto estas modificações poderiam alterar a capacidade de ligação dos antagonistas endotelinérgicos aos seus receptores.

Finalmente, outra possibilidade para tentar explicar a heterogeneidade de bloqueio de respostas a agonistas endotelinérgicos por um mesmo antagonista é a ocorrência de interações funcionais entre receptores ET_A e ET_B. Um mecanismo de interação funcional entre receptores, ou seja *cross talk*, já havia sido proposto pelo nosso grupo para explicar nossos resultados na VB de cobaia (Cardozo *et al.*, 1997). Nessa preparação, a associação dos antagonistas BQ-123 e BQ-788 inibiu completamente as respostas à ET-3, apesar dessa combinação não afetar (Cardozo *et al.*, 1997), ou afetar apenas parcialmente (Huang *et al.*, 2001), as respostas à ET-1. A possibilidade de interação dos receptores ET_A e ET_B também já foi sugerida em outras preparações, como na artéria pulmonar de coelho, brônquio humano, células cardíacas de Girardi humanas e astrócitos de ratos (Fukuroda *et al.*, 1994; 1996; Osaki *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1998). Neste sentido, tem sido observado que receptores acoplados a proteínas G formam homo- ou heterodímeros, tanto com receptores relacionados, como com receptores da mesma superfamília para ligantes completamente diferentes. O receptor GABA_B do ácido gama-aminobutírico, por exemplo, que é um receptor com sete domínios transmembrana acoplado à proteína G, necessita de heterodimerização de duas subunidades distintas para se tornar um receptor funcional, pois homodímeros de cada subunidade são funcionalmente inativos (Jones *et al.*,

1998; Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). A heterodimerização pode ocorrer ainda entre dois diferentes subtipos de receptores, como é o caso dos receptores opióides κ e δ , resultando num novo receptor com ligações e propriedades funcionais distintas (Jordan e Devi, 1999). Por fim, um exemplo ainda mais extremo é o heterodímero que agrega o receptor D2R da dopamina ao SSTR5 da somatostatina, que origina um receptor novo, com atividade funcional aumentada (Rocheville *et al.*, 2000).

A possibilidade de heterodimerização também tem sido aventada para os receptores endotelinérgicos. Em estudos conduzidos com astrócitos de ratos, células que contêm ambos os receptores para as ETs, verificou-se que a resposta induzida pela ET-3, um agonista predominantemente ET_B, foi abolida por antagonistas de receptores ET_B, no entanto somente a associação de antagonistas ET_A e ET_B foi capaz de reduzir ou abolir a resposta à ET-1 (Jensen *et al.*, 1998; Hasselbalt *et al.*, 1998; Blomstrand *et al.*, 1999). Assim, a heterodimerização dos receptores ET_A e ET_B parece esclarecer essa diversidade funcional na estimulação, uma vez que estes achados sugerem que a molécula de ET-1 esteja ligando-se simultaneamente a sítios do receptor ET_A e receptor ET_B (Ehrenreich, 1999). Talvez uma situação análoga esteja ocorrendo na VB, tanto de coelho como de cobaia, uma vez que nesta última preparação, por exemplo, administrados isoladamente, o BQ-123 não alterou e o BQ-788 antagonizou apenas discretamente as

respostas à ET-3, mas a incubação conjunta de ambos os antagonistas aboliu por completo as respostas a este peptídeo (Cardozo *et al.*, 1997). No entanto, experimentos adicionais serão necessários para elucidar esta hipótese.

5.3. - Importância dos prostanóides e do Ca^{2+} intracelular nas contrações induzidas por endotelinas na vesícula biliar isolada de cobaia

Embora um estudo anterior tenha relatado que a INDO, um inibidor não-seletivo de ciclooxigenases, não altera as contrações induzidas pela ET-1 na VB de cobaia (Moumami *et al.*, 1992), resultados obtidos em nosso laboratório evidenciaram que tanto a INDO como o ibuprofeno, outro bloqueador da ciclooxigenase, causaram redução estatisticamente significativa das respostas da VB à ET-1 (Cardozo, 1996). Essa discrepância instigou-nos, inicialmente, a ampliar nossos estudos com a finalidade de confirmar nossos resultados. Neste sentido, o fato da INDO ter causado inibições ainda mais acentuadas das contrações induzidas pela ET-3 e pela SRTX, comprovou a participação dos eicosanóides mediando os efeitos das ETs na VB de cobaia, embora não esclareça as razões da divergência com o relato de Moumami *et al.* (1992).

Os efeitos contráteis da ET-1 na VB de cobaia, coelho e humana envolvem ambos os receptores ET_A e ET_B (Cardozo *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001; resultados do presente trabalho). Pelo menos na VB de cobaia e humana, ambos os receptores parecem estar restritos às células musculares

lisas (Huang *et al.*, 2001). Parte do presente estudo procurou avaliar qual o grau de acoplamento de receptores ET_A e ET_B a mecanismos contráteis dependentes de prostanóide nesta preparação. A utilização de ET-1 foi inviabilizada, pois corroborando estudos anteriores (Battistini *et al.*, 1994; Cardozo *et al.*, 1997), nenhum dos dois antagonistas isoladamente, BQ-123 ou BQ-788 (ambos a 1 μ M), foi efetivo em antagonizar as contrações induzidas por este agonista. Como alternativa para contornar esse problema, avaliamos se a INDO poderia afetar diferencialmente as respostas da VB de cobaia induzidas pela ET-3 através de receptores ET_A ou ET_B , na presença de BQ-788 ou BQ-123, respectivamente. Cada antagonista reduziu acentuadamente a reatividade da preparação à ET-3, com o BQ-788 e o BQ-123 afetando principalmente, mas não exclusivamente, as alterações produzidas por concentrações mais baixas e mais altas do peptídeo, respectivamente. Esses perfis distintos de ação de cada antagonista parecem coerentes com a maior afinidade do peptídeo pelo receptor ET_B , quando comparado ao ET_A . Além disso, o fato das respostas induzidas pela ET-3 na VB de cobaia serem completamente abolidas quando os dois antagonistas são associados (Cardozo *et al.*, 1997), reforça a adequação do presente protocolo em realizar o bloqueio do receptor ET_A e ET_B . Nessas condições, a INDO influenciou diferencialmente os efeitos induzidos pela ET-3, dependendo do antagonista utilizado. Na presença de BQ-123 (i.e. quando os receptores ET_A

estavam bloqueados), a INDO praticamente aboliu as respostas à ET-3, de maneira bastante semelhante ao que foi observado contra as respostas induzidas (na ausência de BQ-123) pela SRTX, agonista seletivo de receptor ET_B. Contudo, quando os receptores ET_B estavam bloqueados com o BQ-788, disponibilizando assim apenas os receptores ET_A, a INDO potencializou as contrações induzidas pela ET-3 na VB de cobaia de modo pronunciado. Convém ressaltar que este conjunto de resultados é consistente com o grau variado de inibição induzida pela INDO das contrações causadas pela ET-1, ET-3 e SRTX, na ausência de quaisquer antagonistas, considerando a afinidade relativa de cada um desses agonistas por receptores ET_A e ET_B.

Os diversos mecanismos de transdução acoplados aos receptores ET_A e ET_B são, de um modo geral, muito similares na maioria dos tecidos, inclusive no músculo liso vascular (para revisão ver Sokolovsky, 1995). No entanto, várias evidências indicam que cada um desses subtipos de receptores pode mediar a contração do músculo liso das vias aéreas de humano, rato e cobaia através de mecanismos distintos de transdução de sinal (Maxwell, *et al.*, 1998; Inui, *et al.*, 1999). Os resultados obtidos com a ET-3 sugerem que as contrações da VB de cobaia decorrentes da estimulação de receptores ET_A e ET_B são modulados, em sentidos opostos, por eicosanóides dependentes da via da ciclooxigenase com ações distintas sobre a contratilidade da

musculatura lisa. De alguma forma, ao serem ativados pela ET-3, os receptores ET_B parecem sinalizar a geração de eicosanóides contráteis, enquanto os receptores ET_A provavelmente sinalizam a produção de eicosanóides que limitam a magnitude da contração da VB de cobaia.

Diante das evidências funcionais de que cada subtipo de receptor endotelinérgico estaria acoplado diferencialmente à produção de prostanóides, procuramos confirmar a habilidade das ETs em estimular a síntese de prostanóides na VB de cobaia. Nesse sentido, observamos que tanto a ET-1, quanto a ET-3 e a SRTX aumentaram a liberação de 6-ceto-PGF_{1 α} , o metabólito estável da prostaciclina. A liberação estimulada por ET-3 e SRTX foi significativamente menor que a causada por ET-1, em todas as concentrações testadas. É importante salientar, ainda, que a ET-1 também induziu liberação de TXB₂, o metabólito estável da TXA₂, mas este efeito foi muito menor que o evidenciado para 6-ceto-PGF_{1 α} . Esses resultados constituem a primeira demonstração direta de liberação de prostanóides pelo sistema endotelinérgico na VB. Além disso, a inibição acentuada da liberação, tanto basal quanto induzida por ET-1, de 6-ceto-PGF_{1 α} causada pela INDO confirma que os prostanóides são formados a partir do ácido araquidônico através da via da ciclooxigenase. Este achado alinha-se a relatos de que a estimulação tanto de receptores ET_A como de ET_B do músculo liso podem ativar a fosfolipase A₂ (para revisão ver Sokolovsky, 1995).

Um conjunto final de experimentos foi realizado com o propósito de investigar se a síntese de prostanóides influenciaria a relação entre as contrações e as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pela ET-1 e a SRTX. As alterações na tensão e na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pela ET-1 e SRTX na VB apresentaram decursos temporais bastante lentos e muito semelhantes. Além disso, análises de regressão linear revelaram que ambos os efeitos de cada um dos agonistas estão fortemente correlacionados. Em diversos tecidos, tanto vasculares quanto não-vasculares, a contração do músculo liso produzida pela ativação de receptores endotelinérgicos está associada com uma alteração bifásica na $[Ca^{2+}]_i$, caracterizada por um pico rápido e transitório seguido de uma elevação menos acentuada mas sustentada. Esses componentes da resposta devem-se, respectivamente, à mobilização dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático por ação do inositol trifosfato e ao influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais operados por voltagem e/ou por receptores ativados pelas ETs (para revisão ver Pollock *et al.*, 1995; Sokolovsky, 1995). Da mesma forma que a VB, o músculo liso da traquéia de cobaia também expressa ambos os receptores ET_A e ET_B , cada qual acoplado a contração e elevação na $[Ca^{2+}]_i$. Nessa preparação, a estimulação de receptores ET_A causa uma resposta tipicamente bifásica no que tange alterações da $[Ca^{2+}]_i$, enquanto que a estimulação dos receptores ET_B induz somente a elevação sustentada (Inui *et al.*, 1999). No entanto, nossos resultados indicam que a

principal fonte do Ca^{2+} necessário para promover a contração induzida por estimulação de receptores ET_A e ET_B na VB de cobaia seja o meio extracelular. O fato das respostas contráteis da VB de cobaia à ET-1 serem praticamente abolidas pela remoção de Ca^{2+} extracelular (Moumami *et al.*, 1992; Cardozo, 1996) reforçam esta hipótese. Ainda com relação a este ponto, ambos estes estudos demonstraram que a nicardipina inibe substancialmente, mas não abole, as contrações da VB de cobaia induzidas por ET-1. Assim, parece evidente que parte considerável do influxo de Ca^{2+} estimulado pela ET-1 decorre da ativação de canais seletivos de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L.

Ao inibir seletivamente o efeito contrátil da ET-1, mas não o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido por este agonista, a INDO diminui significativamente a inclinação da reta de regressão linear que correlaciona ambos estes parâmetros. No entanto, a INDO apresentou um perfil de ação claramente distinto em relação às contrações e aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzidos pela SRTX. Neste caso, ambos os efeitos da SRTX foram inibidos igualmente, de modo que a inclinação da curva de regressão linear que correlaciona os dois efeitos do agonista permaneceu inalterada. A influência diferenciada da INDO sobre as respostas induzidas pela estimulação simultânea de receptores ET_A e ET_B (com ET-1) ou somente de receptores ET_B (com SRTX), sugere fortemente que cada subtipo de receptor está acoplado a mecanismos de

transdução de sinal que dependem da geração de prostanóides com perfis de ação distintos.

Embora tenhamos observado que a ET-1 causa liberação de 6-ceto-PGF_{1α} e de TXB₂ (ainda que em grau limitado), isto não significa necessariamente que a prostaciclina (ou mesmo o tromboxano A₂) seja o prostanóide responsável pelo componente INDO-sensível dos efeitos contráteis e mobilizadores de Ca²⁺ da ET-1 ou da SRTX. Neste sentido, há várias considerações a serem feitas. Primeiro, ainda que a ET-1 libere mais prostaciclina do que a SRTX, ambos os agonistas foram equiefetivos em causar contração na maior concentração testada (100 nM), e baixas concentrações de SRTX (1 e 10 nM) foram mais efetivas do que aquelas da ET-1 em aumentar a [Ca²⁺]_i. Outra evidência é de que a INDO exerce maior inibição frente à contração e aumento da [Ca²⁺]_i induzido pela SRTX do que pela ET-1. Por fim, a prostaciclina é muito menos potente do que outros prostanóides (*i.e.* prostaglandina E₂ ou U46619, este último um análogo sintético do endoperóxido e/ou tromboxano A₂) em contrair a VB de cobaia (Wood *et al.*, 1980). Nesse sentido, foi demonstrado recentemente que a bradicinina, outro potente agonista contrátil da VB de cobaia (Cabrini e Calixto, 1997), promove a liberação de prostaciclina e prostaglandina E₂ desse órgão (Bogar *et al.*, 1999).

O presente estudo demonstrou um efeito diferencial da INDO sobre as respostas contráteis e aumentos simultâneos de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos pela ET-1 (mediado por ambos os receptores ET_A e ET_B) e SRTX (mediado somente por receptores ET_B) na VB de cobaia. Essas diferenças sugerem que, nesta preparação, os receptores ET_A e ET_B estão acoplados a mecanismos que estimulam a produção de prostanóides (ou conjuntos de prostanóides) distintos que exercem influências inibitórias e excitatórias na contratilidade do músculo liso, respectivamente, dependendo do balanço entre suas ações individuais em seus respectivos receptores. Outra possibilidade para explicar a relativa ineficácia da INDO em inibir as respostas contráteis e de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos pela ET-1, quando comparado aos resultados obtidos com SRTX, seria o desvio de ácido araquidônico mobilizado pela ativação de receptores ET_A para a via da lipooxigenase, dando origem a leucotrienos. Nesse sentido, há relatos de que o bloqueio da ciclooxigenase estimula a formação de cisteinil-leucotrienos em vias aéreas isoladas de animais e em uma parcela de pacientes asmáticos (para revisão, ver Babu e Salvi, 2000), e que os cisteinil-leucotrienos C_4 , D_4 e E_4 são potentes agentes contráteis da VB de cobaia (Falcone e Krell, 1992).

Esse nosso último conjunto de resultados, mostrando efeitos diferenciais da INDO sobre contrações e variações de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por ET-1 e SRTX, alinham-se àquele mostrando que contrações à ET-3 mediadas

através de receptores ET_A e ET_B são potencializadas e inibidas, respectivamente, pela INDO. Além disso, parecem coadunar-se com os resultados do primeiro conjunto de experimentos realizados com a VB, que mostraram um efeito inibitório do bloqueador de ciclooxigenase menor sobre as contrações induzidas por ET-1, do que por ET-3 e SRTX (resultados da Figura 9). A Figura 22 ilustra, de forma esquemática, nossa proposta de que prostanóides gerados em resposta à ativação de receptores ET_A ou ET_B tem influências distintas sobre a musculatura lisa da VB de cobraia. Ambos os receptores estão acoplados a ativação da fosfolipase A_2 , formação de ácido araquidônico e geração de prostanóides através da via das ciclooxigenases. No entanto, a ativação do receptor ET_B promove a formação de um conjunto de prostanóides cujo efeito final parece ser predominante excitatório sobre a mobilização de Ca^{2+} a partir do meio extracelular e conseqüentemente de contração. Por outro lado, a ativação do receptor ET_A induz a formação de um conjunto de prostanóides que tem um efeito predominantemente inibitório sobre a mobilização de Ca^{2+} para a indução do efeito contrátil. Assim, ao inibir-se as ciclooxigenases com a INDO, remove-se a influência excitatória dos prostanóides formados através da estimulação do receptor ET_B e observa-se conseqüentemente uma redução do efeito contrátil. No entanto, a remoção da influência inibitória induzida pela INDO causa uma potencialização dos efeitos contráteis mediados através dos receptores ET_A .

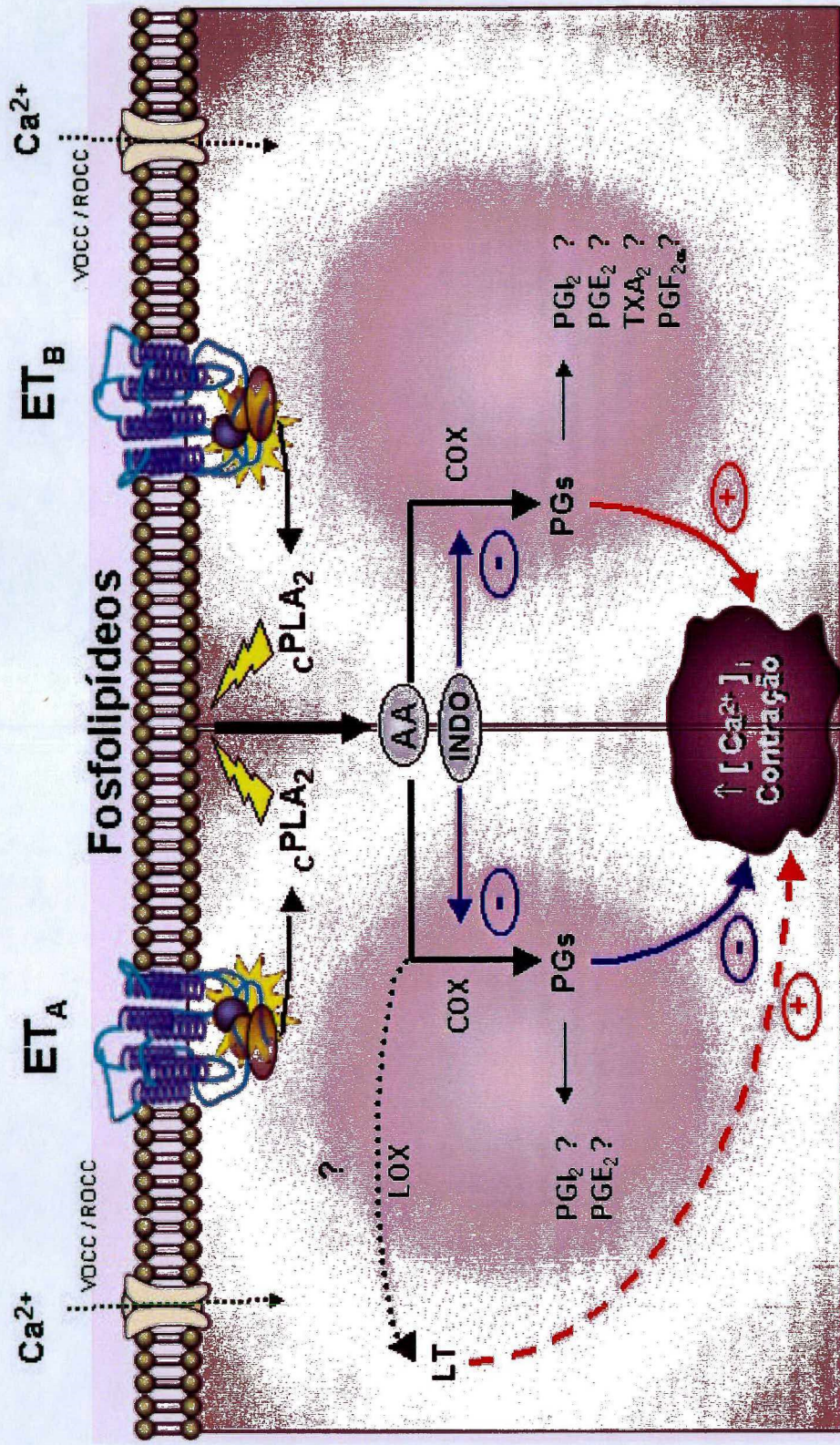


Figura 22 – Representação esquemática da proposta de que prostanoídes gerados em resposta à ativação de receptores ET_A ou ET_B tem influências distintas sobre a musculatura lisa da VB de cobaia. ET_A e ET_B, receptores endotelinérgicos; VOCC, canais de cálcio operados por voltagem; ROCC, canais de cálcio operados por receptor; cPLA₂, fosfolipase citosólica A₂; AA, ácido araquidônico; INDO, indometacina; COX, ciclooxigenase; LOX, lipooxigenase; PGE₂, prostaglandinas; LT, leucotrienos; PGI₂, prostaciclina; TX, tromboxano.

Ainda restam ser definidos quais são efetivamente os prostanóides responsáveis pelas influências excitatória e inibitória sobre a mobilização de Ca^{2+} para a contração da VB de cobaia. Também parece pertinente investigar, no futuro, a possibilidade da INDO desviar o ácido araquidônico mobilizado pela fosfolipase A_2 em resposta à ativação de receptores ET_A para conversão em leucotrienos por ação de lipooxigenases.

5.4. - Implicações fisiológicas ou fisiopatológicas

O envolvimento do sistema endotelinérgico no trato biliar tem sido evidenciado tanto em condições fisiológicas, participando do controle do fluxo biliar e dos mecanismos que regulam a concentração e a composição da bile, como em situações patológicas que afetam o trato biliar. A função da VB é dupla, ou seja armazenar e concentrar a bile hepática durante os períodos de jejum, bem como liberar a bile concentrada, no duodeno, em resposta a ingestão alimentar. No homem, as células epiteliais que revestem os ductos interlobulares e biliar comum e a mucosa da VB secretam ET-1 (Housset *et al.*, 1993a). Este peptídeo parece estar envolvido nos processos de secreção e fluxo biliar, pois estimula o transporte de ácidos biliares dos hepatócitos para os canalículos hepáticos (Tanaka *et al.*, 1994) e a frequência de contração destes canalículos (Kamimura *et al.*, 1993). Evidenciamos ainda, que na cobaia, a ET-1 exerce efeitos contrários nos diferentes componentes do trato biliar extra-hepático. Esse peptídeo contrai apenas a

VB (Moumami *et al.*, 1992; Battistini *et al.*, 1994; Cardozo *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001; resultados do presente estudo), sendo este efeito mediado por receptores ET_A e ET_B, e pelo menos em parte, pela síntese de prostanóides excitatórios (resultados do presente estudo). Por outro lado, a ET-1 não causa qualquer resposta contrátil do ducto hepático, do ducto cístico ou da porção proximal do ducto biliar comum (Koepp *et al.*, 2001). Interessantemente, ao compararmos os efeitos da ET-1 com dois importantes agonistas do trato biliar, a CCK-8 e o carbacol, verificamos que de um modo bastante semelhante à ET-1, eles também contraem a VB e não exercem efeitos contráteis sobre os ductos hepáticos, cístico e a porção proximal do ducto biliar comum. Em contraste, ambos os agonistas induzem contrações da porção distal do ducto biliar comum e a ET-1 aparentemente não causa qualquer resposta contrátil direta dessa porção. No entanto, ampliando estes achados, constatamos que, na verdade, a ET-1 contrai esta preparação, porém este efeito é modulado pela síntese de prostanóides relaxantes. Vimos ainda que, embora não induza qualquer efeito contrátil direto sobre as porções coledocal ou papilar do esfíncter de Oddi, a ET-1 é capaz de atenuar contrações da porção coledocal (mas não a papilar) por um mecanismo dependente de prostanóides e de receptores ET_A e ET_B.

Assim, apesar das limitações inerentes aos estudos *in vitro* com tecidos contendo musculatura lisa, os perfis diferentes de ação da ET-1 em porções

distintas do trato biliar extra-hepático podem ser integrados de maneira a conjecturar um possível papel fisiológico deste peptídeo. Ao ser sintetizada pelas células epiteliais do trato biliar, sua ação contrátil prostanóide-dependente sobre a musculatura lisa subjacente da VB, em conjunto com seu efeito depressor (também prostanóide-dependente) nas porções distal do ducto biliar comum e coledocal do esfíncter de Oddi, poderiam contribuir para o extravasamento de bile para o duodeno. A possível importância fisiológica do relaxamento da porção coledocal do esfíncter de Oddi em resposta à ativação de receptores endotelinérgicos pela ET-1 é reforçada pela possibilidade da indometacina induzir colestase por aumento do tono do esfíncter de Oddi (Yasar *et al.*, 1999). No entanto, estudos mais aprofundados *in vivo* são necessários para tentar elucidar os possíveis papéis fisiológicos da ET-1 sobre a motilidade nesse sistema.

Cabe aqui especular acerca das possíveis implicações fisiológicas e/ou fisiopatológicas da presença de ambos os subtipos de receptores endotelinérgicos na musculatura lisa da VB, bem como as conseqüências do acoplamento diferencial de cada um à geração de prostanóides. Ao que parece, a ET-1 possivelmente é a isoforma endógena fisiologicamente mais relevante no trato biliar (Fouassier *et al.*, 1998). Este agonista apresenta alta afinidade tanto por receptores ET_A quanto ET_B. Neste aspecto, se considerarmos a hipótese de que a ET-1 causa contração da VB de cobaia

através da estimulação simultânea de receptores ET_A e ET_B (sejam eles homo- ou heterodiméricos), nossos resultados sugerem que esta ativação sinaliza a produção de um conjunto de prostanóides com influências tanto excitatórias como inibitórias sobre a musculatura lisa. Nossos resultados demonstram que, em condições normais, há um predomínio da influência excitatória dos prostanóides sobre a inibitória. Contudo, alterações na proporção relativa de receptores ET_A e ET_B da VB, ou no perfil de prostanóides gerados em resposta à estimulação destes receptores poderia acarretar distúrbios fisiopatológicos no trato biliar.

Por outro lado, foi proposta recentemente uma nova hipótese sobre o envolvimento do sistema purinérgico na transmissão nervosa de informações mecanosensoriais (para revisão ver Burnstock, 2001). A proposição se baseia no fato de que a distensão de vísceras com formatos de tubo (tais como o ureter, ducto salivar e intestino) ou de saco (como a bexiga e a VB) induz a liberação de ATP a partir das células epiteliais de revestimento. Em situações em que ocorre distensão moderada, o ATP liberado atua preferencialmente nos receptores $P2X_3$ nas fibras nervosas sensoriais intrínsecas (de limiar baixo), contribuindo para o peristaltismo reflexo. No entanto, quando ocorre distensão severa, freqüentemente associada com dor, o ATP seria liberado em quantidades maiores e também atuaria nos receptores $P2X_3$ localizados nas fibras nervosas sensoriais

extrínsecas (de limiar alto), as quais enviam mensagens através dos gânglios da raiz dorsal para os centros da dor no sistema nervoso central. Há evidências de que ETs também estimulam fibras sensoriais extrínsecas (Gokin *et al.*; 2001), causam dor (Piovezan *et al.*, 2000), induzem liberação de prostanóides (presente estudo) e potencializam efeitos do ATP mediados por purinoceptores da classe P2X (Luciano *et al.*, 1995).

Estudos conduzidos com pacientes eleitos para colecistectomia devido à colecistite revelaram que a bile dos mesmos apresenta aumentos pronunciados da concentração de ET-1 (em mais de 10 vezes, Kraus *et al.*, 1996), PGI₂ e PGE₂ (em cerca de 4 vezes; Myers e Bartula, 1992). O aumento do conteúdo desses dois prostanóides no lúmen da VB parece não somente alterar a absorção de fluidos, como também aumentar o grau de distensão deste órgão, favorecendo a ruptura da mucosa e o aparecimento de dor biliar (Saverymuttu *et al.*, 1979; Myers e Cheung, 1984; Beckingham, 2001). Diante dessas evidências, especulamos que a ET-1 sintetizada pelo epitélio biliar possa participar na mediação de dores biliares ao desempenhar uma função análoga no trato biliar, ao ativar fibras nervosas sensoriais extrínsecas presentes na VB, seja diretamente ou através da contração exagerada deste órgão, estimulação da síntese de prostanóides e/ou por potencialização dos efeitos do ATP sobre estes neurônios.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- A exemplo da VB de cobaia, a ET-1 também é um potente agonista contrátil da VB isolada de coelho, sendo mais potente que a serotonina e o carbacol, mas menos potente que a CCK-8. Porém, considerando que as contrações induzidas por SRTX ou IRL 1620 na VB de coelho são de magnitudes semelhante às causadas por ET-1, enquanto que na VB de cobaia causam efeitos menores que a ET-1, os resultados sugerem que este tecido apresenta uma predominância maior de receptores ET_B sobre os ET_A na VB de coelho do que de cobaia.
- A exemplo do que ocorre na VB de cobaia, tanto os receptores ET_A quanto os ET_B presentes na VB de coelho mostram-se muito pouco susceptíveis ao bloqueio por antagonistas seletivos desses receptores.
- O fato da ET-1 e a SRTX efetivamente estimular a produção de eicosanóides derivados da via da ciclooxigenase (PGI₂) da VB de cobaia, aliado à demonstração de efeitos inibitórios da INDO sobre contrações induzidas por ET-1, ET-3 e SRTX confirmam que os prostanóides são importantes na mediação/modulação dos efeitos contráteis das endotelinas nessa preparação. Contudo, o menor efeito depressor da INDO sobre contrações da VB de cobaia induzidas por ET-1 do que por SRTX, bem como o efeito diferencial deste bloqueador de ciclooxigenase sobre respostas causadas por ET-3 através de receptores ET_A ou ET_B sugerem

que os receptores ET_B estão acoplados à geração de eicosanóides com ação predominantemente contrátil, enquanto os ET_A parecem sinalizar a produção de eicosanóides que, no conjunto, limitam a magnitude da contração desta preparação.

- As contrações tônicas gradativas da VB de cobaia induzidas por ET-1 e SRTX estão fortemente correlacionadas a aumentos simultâneos, também gradativos, da concentração intracelular de Ca^{2+} intracelular livre. Esses aumentos lentos, gradativos e sustentados na $[Ca^{2+}]_i$ sugerem, na luz de achados anteriores (Moumami *et al.*, 1992), que o cátion seja mobilizado majoritariamente do meio extracelular, pelo menos em parte através de canais seletivos de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L.
- O fato da INDO apresentar perfis inibitórios distintos sobre as alterações de tensão e de intensidade da fluorescência induzidas pela ET-1 e SRTX na VB de cobaia fortalecem a hipótese de que os receptores ET_A e ET_B estão acoplados a mecanismos que ativam a produção de conjuntos distintos de prostanóides que, por sua vez, exercem influências inibitórias e excitatórias na contratilidade do músculo liso, respectivamente. A relevância fisiológica e/ou fisiopatológica destes achados sobre as funções do trato biliar permanece a ser esclarecida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASSI, Z.A.; GOLOMB, E.; BRIDENBAUGH, R.; KEISER, H.R. Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC.3.4.24.11. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 1024-8, 1993.
- ALAM, I.; BASS, N.M.; BACCHETTI, P.; GEE, L.; ROCKEY, D.C. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am. J. Gastroenterol.*, **95**: 199-203, 2000.
- ALLCOCK, G.H.; BATTISTINI, B.; FOURNIER, A.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Characterization of endothelin receptors mediating mechanical responses to the endothelins in the isolated stomach strip of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**: 120-6, 1995.
- ALLEN, J.M.; GU, J.; ADRIAN, T.E.; POLAK, J.M.; BLOOM, S.R. Neuropeptide Y in the guinea-pig biliary tract. *Experientia*, **40**: 765-7, 1984.
- AMBAR, I.; SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur. J. Pharmacol.*, **245**: 31-41, 1993.
- AMER, M.S. Studies with cholecystokinin *in vitro*. 3. Mechanism of the effect on the isolated rabbit gall bladder strips. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **183**: 527-34, 1972.
- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**: 730-732, 1990.
- BABU, K.S.; SALVI, S.S. Aspirin and asthma. *Chest.*, **118**: 1470-6, 2000.
- BARNES, K.; BROWN, C.; TURNER, A.J. Endothelin-converting enzyme: ultrastructural localization and its recycling from the cell surface. *Hypertension*, **31**: 3-9, 1998.
- BATTISTINI, B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SIROIS, P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.*, **68**: 600-628, 1993.
- BATTISTINI, B.; O'DONNELL, L.J.D.; WARNER, T.D.; FOURNIER, ALAIN.; FARTHING, M.J.G.; VANE, J. R. Characterization of endothelin (ET) receptors in the isolated gall bladder of the guinea-pig: evidence for an additional ET receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.*, **112**: 1244-1250, 1994.
- BATTISTINI, B.; WOODS, M.; O'DONNELL, L.J.D.; WARNER, T.D.; CORDER, R.; FOURNIER, A.; FARTHING, M.J.G.; VANE, J.R. Contractile activity of endothelin precursors in isolated gallbladder of the guinea-pig: presence of an endothelin-converting enzyme. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1383-1390, 1995.
- BAUER, A.J.; HANANI, M.; MUIR, T.C.; SZURSZEWSKI, J.H. Intracellular recordings from gallbladder ganglia of opossums. *Am. J. Physiol.*, **260**: G299-306, 1991.
- BAX, W. A.; SAXENA, P. R. The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**: 379-386, 1994.
- BECKINGHAM, I.J. ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Gallstone disease. *BMJ*, **322**: 91-94, 2001.
- BECKINGHAM, I.J.; KRIGE, J.E. ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system: Liver and pancreatic trauma. *BMJ*, **322**: 783-5, 2001.

- BEHAR, J.; BIANCANI, P. Effect of cholecystokinin and the octapeptide of cholecystokinin on the feline sphincter of Oddi and gallbladder. Mechanisms of action. *J. Clin. Invest.*, **66**: 1231-9, 1980.
- BEINBORN, M.; LEE, Y.M.; MCBRIDE, E.W.; QUINN, S.M.; KOPIN, A.S. A single amino acid of the cholecystokinin-B/gastrin receptor determines specificity for non-peptide antagonists. *Nature*, **364**: 362, 1993.
- BILLAH, M. M.; ANTHES, J. C.; MULLMANN, T. J. Receptor-coupled phospholipase D: regulation and functional significance. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**: 324-329, 1991.
- BLOCH, D. K.; HONG, C. C.; EDY, R. L.; SHOWS, T. W.; QUERTERMOUS, T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene-vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. *Genomics*, **10**: 236-242, 1991.
- BLOCH, K. D.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; QUETERMOUS, T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J. Biol. Chem.*, **264**: 18156-18161, 1989b.
- BLOCH, K.D.; FRIEDRICH, S.P.; LEE, M.E.; EDDY, R.L.; SHOWS, T.B.; QUETERMOUS, T. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J. Biol. Chem.*, **264**: 10851-7, 1989a.
- BLOMSTRAND, F.; GIAUME, C.; HANSSON, E.; RONNBACK, L. Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling. *Am. J. Physiol.*, **277**: C616-27, 1999.
- BOGAR, L.J.; BARTULA, L.L.; PARKMAN, H.P.; MYERS, S.I. Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase. *J. Surg. Res.*, **84**: 71-6, 1999.
- BOHM, S.K.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, **322**: 1-18, 1997.
- BURNSTOCK, G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**: 182-188, 2001.
- CABRINI, D.A.; CALIXTO, J.B. Characterization of des-Arg9-bradykinin-induced contraction in guinea-pig gallbladder in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, **331**: 31-8, 1997.
- CAI, L.; WANG, G.J.; MUKHERJEE, K.; XU, Z.L.; KHALIL, M.; CHERIAN, M.G.; CHAKRABARTI, S. Endothelins and their receptors in cirrhotic and neoplastic livers of Canadian and Chinese populations. *Anticancer Res.*, **19**: 2243-7, 1999.
- CARDOZO, A.M. Efeitos das endotelinas sobre a vesícula biliar isolada de cobaia. Dissertação de Mestrado, UFSC, pp. 98, 1996.
- CARDOZO, A.M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; YANO, M.; FRANK JR, P.A.; RAE, G.A. Influence of endothelin ET_A and ET_B receptor antagonists on endothelin-induced contractions of the guinea pig isolated gall bladder. *Regul. Pept.*, **69**: 15-23, 1997.
- CAZAUBON, S.M.; RAMOS-MORALES, F.; FISCHER, S.; SCHWEIGHOFFER, F.; STROSBERG, A.D.; COURAUD, P.O. Endothelin induces tyrosine phosphorylation and GRB2 association of Shc in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, **269**: 24805-9, 1994.
- CHIOU, W.J.; MAGNUSON, S.R.; DIXON, D.; SUNDY, S.; OPGENORTH, T.J.; WU-WONG, J.R. Dissociation characteristics of endothelin receptor agonists and

- antagonists in cloned human type-B endothelin receptor. *Endothelium*, **5**: 179-89, 1997.
- CHIOU, W.J.; SHIOSAKI, K.; TASKER, A.S.; WU-WONG, J.R. Characterization of two endothelin converting enzymes and their preference for big endothelin-1 and -2 as substrates. *Life Sci.*, **54**: 1613-9, 1994.
- CHO, J.J.; HOCHER, B.; HERBST, H.; JIA, J.D.; RUEHL, M.; HAHN, E.G.; RIECKEN, E.O.; SCHUPPAN, D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*, **118**: 1169-78, 2000.
- CLAVE, R.A.; GASPAR, M.R. Incidence of gallbladder disease after vagotomy. *Am. J. Surg.*, **118**: 169-76, 1969.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M.; YANO, M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET_A receptors in the rat perfused lung. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 773-775, 1992.
- DANI, R.; CASTRO, L.P. Gastroenterologia clínica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 9797-9800, 1988.
- DENAULT, J.-B.; CLAING, A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SAWAMURA, T.; KIDO, T.; MASAKI, T.; LEDUC, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.*, **362**: 276-280, 1995.
- DOI, T.; SUGIMOTO, H.; ARIMOTO, I.; HIROAKI, Y.; FUJIYOSHI, Y. Interactions of endothelin receptor subtypes A and B with Gi, Go, and Gq in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **38**: 3090-9, 1999.
- DOUGLAS, S.A.; BECK Jr., G.R.; ELLIOTT, J.D.; OHLSTEIN, E.H. Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1529-1540, 1995.
- DOUGLAS, S.A.; OHLSTEIN, E.H. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J. Vasc. Res.*, **34**: 152-164, 1997.
- EAKES, A.T.; HOWARD, K.M.; MILLER, J.E.; OLSON, M.S. Endothelin-1 production by hepatic endothelial cells: characterization and augmentation by endotoxin exposure. *Am. J. Physiol.*, **272**: G605-G611, 1997.
- EHRENREICH, H. The astrocytic endothelin system: toward solving a mystery focus on "distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling". *Am. J. Physiol.*, **277**: C614-5, 1999.
- ELSHOURBAGY, N.A.; ADAMOU, J.E.; GAGNON, A.W.; WU, H.L.; PULLEN, M.; NAMBI, P. Molecular characterization of a novel human endothelin receptor splice variant. *J. Biol. Chem.*, **271**: 25300-25307, 1996.
- EMORI, T.; HIRATA, Y.; MARUMO, F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett.*, **263**: 261-264, 1990.

- EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.*, **270**: 15262-8, 1995.
- FALCONE, R.C.; KRELL, R.D. Guinea pig gall bladder contains a single peptide leukotriene receptor which resembles that present in human conducting airway smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**: 1095-102, 1992.
- FATTINGER, K.; FUNK, C.; PANTZE, M.; WEBER, C.; REICHEN, J.; STIEGER, B.; MEIER, P.J. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**: 223-231, 2001.
- FERNANDEZ-PATRON, C.; RADOMSKI, M.W.; DAVIDGE, S.T. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ. Res.*, **85**: 906-911, 1999.
- 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.
- FONG, T.M.; CASCIERI, M.A.; YU, H.; BANSAL, A.; SWAIN, C.; STRADER, C.D. Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345. *Nature*, **362**: 350-3, 1993.
- FOUASSIER, L.; CHINET, T.; ROBERT, B.; CARAYON, A.; BALLADUR, P.; MERGEY, M.; PAUL, A.; POUPON, R.; CAPEAU, J.; BARBU, V.; HOUSSET, C. Endothelin-1 is synthesized and inhibits cyclic adenosine monophosphate-dependent anion secretion by an autocrine/paracrine mechanism in gallbladder epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, **101**: 2881-2888, 1998.
- FUKURODA, T.; FUJIKAWA, T.; OZAKI, S.; ISHIKAWA, K.; YANO, M.; NISHIKIBE, M. Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**: 1461-5, 1994.
- FUKURODA, T.; OZAKI, S.; IHARA, M.; ISHIKAWA, K.; YANO, M.; MIYAUCHI, T.; ISHIKAWA, S.; ONIZUKA, M.; GOTO, K.; NISHIKIBE, M. Necessity of dual blockade of endothelin ET_A and ET_B receptor subtypes for antagonism of endothelin-1-induced contraction in human bronchi. *Br. J. Pharmacol.*, **117**: 995-9, 1996.
- FUKURODA, T.; OZAKI, S.; IHARA, M.; ISHIKAWA, K.; YANO, M.; NISHIKIBE, M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 336-8, 1994.
- FUKUSHIMA, Y.; OKA, Y.; SAITOH, T.; KATAGIRI, H.; ASANO, T.; MATSUHASHI, N.; TAKATA, K.; VAN BREDA, E.; YAZAKI, Y.; SUGANO, K. Structural and functional analysis of the canine histamine H₂ receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. *Biochem. J.*, **310**: 553-8, 1995.
- FULTON, D.; GRATTON, J.P.; SESSA, W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**: 818-24, 2001.
- GALLOIS, C.; HABIB, A.; TAO, J.; MOULIN, S.; MACLOUF, J.; MALLAT, A.; LOTERSZTAJN, S. Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-

- 1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **273**: 23183-23190, 1998.
- GANDHI, C.R.; SPROAT, L.A.; SUBBOTIN, V.M. Increased hepatic endothelin-1 levels and endothelin receptor density in cirrhotic rats. *Life Sci.*, **58**: 55-62, 1996.
- GETHER, U.; JOHANSEN, T.E.; SNIDER, R.M.; LOWE 3RD, J.A.; NAKANISHI, S.; SCHWARTZ, T.W. Different binding epitopes on the NK₁ receptor for substance P and a non-peptide antagonist. *Nature*, **362**: 345-348, 1993.
- GHOSH, T.K.; EIS, P.S.; MULLANEY, J.M.; EBERT, C.L.; GILL, D.L. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin. *J. Biol. Chem.*, **263**: 11075-9, 1988.
- GOKIN, A.P.; FAREED, M.U; PAN, H.L.; HANS, G.; STRICHARTZ, G.R.; DAVAR, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. *J. Neurosci.*, **21**: 5358-66, 2001.
- GOTO, K.; HAMA, H.; KASUYA, Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**: 261-90, 1996.
- GRATTON, J.-P.; RAE, G.A.; CLAING, A.; TÉLÉMAQUE, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Different pressor and bronchoconstrictor properties of human big-endothelin-1, 2 (1-38) and 3 in ketamine/xylazine-anaesthetized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 720-726, 1995.
- GRAY, G.A.; WEBB, D.J. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.*, **72**: 109-48, 1996.
- GRIDER, J.R. Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J. Nutr.*, **124(Suppl 8)**: 1334S-1339S, 1994.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190, 1992.
- HARRISON, V.J.; BARNES, K.; TURNER, A.J.; WOOD, E.; CORDER, R.; VANE, J.R. Identification of endothelin-1 and big-endothelin-1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 6344-8, 1995.
- HASEGAWA, H.; HIKI, K.; SAWAMURA, T.; AOYAMA, T.; OKAMOTO Y.; MIWA, S.; SHIMOHAMA, S.; KIMURA, J.; MASAKI, T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.*, **428**: 304-8, 1998.
- HASHIDO, K.; GAMOU, T.; ADACHI, M.; TABUCHI, H.; WATANABE, T.; FURUICHI, Y.; MIYAMOTO, C. Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ET_A receptor abrogated the binding activity to ET-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**: 1241-8, 1992.
- HASSELBLATT, M.; KAMROWSKI-KRUCK, H.; JENSEN, N.; SCHILLING, L.; KRATZIN, H.; SIREN, A.L.; EHRENREICH, H. ETA and ETB receptor antagonists synergistically increase extracellular endothelin-1 levels in primary rat astrocyte cultures. *Brain Res.*, **785**: 253-61, 1998.
- HICKEY, K.A.; RUBANYI, G.; PAUL, R.J.; HIGHSMITH, R.F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **248**: C550-6, 1985.

- HIRATA, Y.; YOSHIMI, H.; TAKAICHI, S.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **239**: 13-7, 1988a.
- HIRATA, Y.; YOSHIMI, H.; TAKATA, S.; WATANABE, T.X.; KUMAGAI, S.; NAKAJIMA, K.; SAKAKIBARA, S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**: 868-75, 1988b.
- HOCHER, B.; RUBENS, C.; HENSEN, J.; GROSS, P.; BAUER, C. Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 498-503, 1992.
- HOFMANN, A.F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch. Intern. Med.*, **159**: 2647-58, 1999.
- HORSTMAYER, A.; CRAMER, H.; SAUER, T.; MULLER-ESTERL, W.; SCHROEDER, C. Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J. Biol. Chem.*, **271**: 20811-9, 1996.
- HOUSSET, C.; CARAYON, A.; HOUSSET, B.; LEGENDRE, C.; HANNOUN, L.; POUPON, R. Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. *Lab. Invest.*, **69**: 750-755, 1993a.
- HOUSSET, C.; ROCKEY, D.C.; BISSELL, D.M. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 9266-9270, 1993b.
- HUANG, S.C.; LEE, M.C.; WEI, C.K.; HUANG, S.M. Endothelin receptors in human and guinea-pig gallbladder muscle. *Regul. Pept.*, **98**: 145-153, 2001.
- HUSAIN, S.; ABDEL-LATIF, A.A. Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A₂ in cat iris sphincter smooth muscle cells. *Biochem. J.*, **342**: 87-96, 1999.
- IHARA, M.; NOGUCHI, K.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; TSUCHIDA, S.; KIMURA, S.; FUKAMI, T.; ISHIKAWA, K.; NISHIKIBE, M.; YANO, M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.*, **50**: 247-255, 1992.
- IMAI, T.; HIRATA, Y.; EMORI, T.; MARUMO, F. Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1 synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension*, **21**: 353-8, 1993.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 2863-2867, 1989a.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MITSUI, Y.; KOBAYASHI, M.; MASAKI, T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.*, **264**: 14954-9, 1989b.
- INUI, T.; NINOMIYA, H.; SASAKI, Y.; MAKATANI, M.; URADE, Y.; MASAKI, T.; YAMAMURA, T. Selective activation of excitation-contraction coupling pathways by ET_A and ET_B receptors in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **126**: 893-902, 1999.

- ISHIKAWA, K.; IHARA, M.; NOGUCHI, K.; MASE, T.; MINO, N.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; FUKAMI, T.; OZAKI, S.; NAGASE, T.; NISHIKIBE, M.; YANO, M. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 4892-4896, 1994.
- JENSEN, N.; HASSELBLATT, M.; SIREN, A.L.; SCHILLING, L.; SCHMIDT, M.; EHRENREICH, H. ET(A) and ET(B) specific ligands synergistically antagonize endothelin-1 binding to an atypical endothelin receptor in primary rat astrocytes. *J. Neurochem.*, **70**: 473-82, 1998.
- JONES, K.A.; BOROWSKY, B.; TAMM, J.A.; CRAIG, D.A.; DURKIN, M.M.; DAI, M.; YAO, W.J.; JOHNSON, M.; GUNWALDSEN, C.; HUANG, L.Y.; TANG, C.; SHEN, Q.; SALON, J.A.; MORSE, K.; LAZ, T.; SMITH, K.E.; NAGARATHNAM, D.; NOBLE, S.A.; BRANCHEK, T.A.; GERALD, C. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*, **396**: 674-9, 1998.
- JORDAN, B.A.; DEVI, L.A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, **399**: 697-700, 1999.
- KAMIMURA, Y.; SAWADA, N.; AOKI, M.; MORI, M. Endothelin-1 induces contraction of bile canaliculi in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 817-822, 1993.
- KARNE, S.; JAYAWICKREME, C.K.; LERNER, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.*, **268**: 19126-19133, 1993.
- KAUPMANN, K.; MALITSCHKEK, B.; SCHULER, V.; HEID, J.; FROESTL, W.; BECK, P.; MOSBACHER, J.; BISCHOFF, S.; KULIK, A.; SHIGEMOTO, R.; KARSCHIN, A.; BETTLER, B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, **396**: 683-7, 1998.
- KAUSHAL, S.; RIDGE, K.D.; KHORANA, H.G. Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 4024-8, 1994.
- KEDZIERSKI, R.M.; YANAGISAWA, M., Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**: 851-876, 2001.
- KENNEDY, A.L.; SACCONI, G.T.; MAWE, G.M. Direct neuronal interactions between the duodenum and the sphincter of Oddi. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **2**: 104-11, 2000.
- KIMURA, S.; KASUYA, Y.; SAWAMURA, T.; SHINMI, O.; SUGITA, Y.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K.; MASAKI, T. Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**: 1182-6, 1988.
- KITSUKAWA, Y.; GU, Z.F.; HILDEBRAND, P.; JENSEN, R.T. Gastric smooth muscle cells possess two classes of endothelin receptors but only one alters contraction. *Am. J. Physiol.*, **266**: G713-21, 1994.
- KOCHVA, E.; BDOLAH, A.; WOLLBERG, Z. Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function. *Toxicon.*, **31**: 541-568, 1993.
- KODA, W.; HARADA, K.; TSUNEYAMA, K.; KONO, N.; SASAKI, M.; MATSUI, O.; NAKANUMA, Y. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in

- regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab. Invest.*, **80**: 1007-1017, 2000.
- KOEPP, J.; CARDOZO, A.M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; RAE, G.A. Influence of indomethacin on effects of endothelin-1 on guinea pig isolated rings of common bile duct and sphincter of Oddi. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001. No prelo.
- KOHNO, M.; MURAKAWA, K.; YASUNARI, K.; YOKOKAWA, K.; HORIO, T.; KURIHARA, N.; TAKEDA, T. Prolonged blood pressure elevation after endothelin administration in bilaterally nephrectomized rats. *Metabolism*, **38**: 712-3, 1989.
- KOJIMA, H.; YAMAO, J.; TSUJIMOTO, T.; UEMURA, M.; TAKAYA, A.; FUKUI, H. Mixed endothelin receptor antagonist, Sb209670, decreases portal pressure in biliary cirrhotic rats in vivo by reducing portal venous system resistance. *J. Hepatol.*, **32**: 43-50, 2000.
- KRAUS, T.; SCHULLER, M.; KLEE, F.; BREDT, M.; MEHRABI, A.; HARTTER, G.; MISSBICHLER, A.; OTTO, G. Validation of endothelin (ET) immunoreactivity in human bile by HPLC. Comparison of biliary ET concentration in liver transplant recipients with values obtained during cholecystectomy. *Transpl. Int.*, **9(Suppl. 1)**: S135-S139, 1996.
- KUDDUS, R.H.; NALESNIK, M.A.; SUBBOTIN, V.M.; RAO, A.S.; GANDHI, C.R. Enhanced synthesis and reduced metabolism of endothelin-1 (ET-1) by hepatocytes – an important mechanism of increased endogenous levels of ET-1 in liver cirrhosis. *J. Hepatol.*, **33**: 725-732, 2000.
- KUMAR, C.S.; NUTHULAGANTI, P.; PULLEN, M.; NAMBI, P. Novel endothelin receptors in the follicular membranes of *Xenopus laevis* oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions. *Mol. Pharmacol.*, **44**: 153-7, 1993.
- LEE, J.A.; ELLIOTT, J.D.; SUTIPHONG, J.A.; FRIESEN, W.J.; OHLSTEIN, E.H.; STADEL, J.M.; GLEASON, J.G.; PEISHOFF, C.E. Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 7164-8, 1994.
- LEHMAN, G.A.; SHERMAN, S. Sphincter of Oddi dysfunction. *Int. J. Pancreatol.*, **20**: 11-25, 1996.
- LEVIN, E.R. Endothelins as cardiovascular peptides. *Am. J. Nephrol.*, **16**: 246-51, 1996.
- LIU, J.; CHEN, R.; CASLEY, D.J.; NAYLER, W.G. Ischemia and reperfusion increase ¹²⁵I-labeled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes. *Am. J. Physiol.*, **258**: H829-35, 1990.
- LOFFLER, B.M.; BREU, V.; CLOZEL, M. Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist Ro 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett.*, **333**: 108-10, 1993.
- LONOVICS, J.; MADACSY, L.; SZEPES, A.; SZILVASSY, Z.; VELOSY, B.; VARRO, V. Humoral mechanisms and clinical aspects of biliary tract motility. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, **228**: 73-89, 1998.
- LUCIANO, L.G.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; CALIXTO, J.B.; RAE, G.A. Endothelin-1 contracts and increases motor responses to ATP in rat seminal vesicle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **26(Suppl. 3)**: S91-S994, 1995.

- MALEK, A.M.; GREENE, A.L.; IZUMO, S. Regulation of endothelin-1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 5999-6003, 1993.
- MALEK, A.M.; LEE, I.W.; ALPER, S.L.; IZUMO, S. Regulation of endothelin-1 gene expression by cell shape and the microfilament network in vascular endothelium. *Am. J. Physiol.*, **273**: C1764-74, 1997.
- MALLAT, A.; LOTERSZTAJN, S. Multiple hepatic functions of endothelin-1: physiopathological relevance. *J. Hepatol.*, **25**: 405-13, 1996.
- MASAKI, T.; MIWA, S.; SAWAMURA, T.; NINOMIYA, H.; OKAMOTO Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur. J. Pharmacol.*, **375**: 133-8, 1999.
- MASAKI, T.; VANE, J.R.; VANHOUTTE, P.M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**: 137-142, 1994.
- MATTERA, G.G.; EGLEZOS, A.; RENZETTI, A.R.; MIZRAHI, J. Comparison of the cardiovascular and neural activity of endothelin-1, -2, -3, and respective proendothelins: effects of phosphoramidon and thiorfan. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 331-337, 1993.
- MAWE, G.M. Nerves and hormones interact to control gallbladder function. *News Physiol. Sci.*, **13**: 84-90, 1998.
- MAXWELL, M.J.; GOLDIE, R.G.; HENRY, P.J. Ca²⁺ signalling by endothelin receptors in rat and human cultured airway smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **125**: 1768-78, 1998.
- MIASIRO, N.; KARAKI, H.; PAIVA, A.C. Heterogeneous endothelin receptors mediate relaxation and contraction in the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **285**: 247-54, 1995.
- MIYAMOTO, Y.; YOSHIMASA, T.; ARAI, H.; TAKAYA, K.; OGAWA, Y.; ITOH, H.; NAKAO, K. Alternative RNA splicing of the human endothelin-A receptor generates multiple transcripts. *Biochem. J.*, **313**: 795-801, 1996.
- MIYAUCHI, T.; GOTO, K. Heart failure and endothelin receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**: 210-7, 1999.
- MIYAUCHI, T.; MASAKI, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.*, **61**: 391-415, 1999.
- MIYAUCHI, T.; SUZUKI, N.; KURIHARA, T.; YAMAGUCHI, I.; SUGISHITA, Y.; MATSUMOTO, H.; GOTO, K.; MASAKI, T. Endothelin-1 and endothelin-3 play different roles in acute and chronic alterations of blood pressure in patients with chronic hemodialysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 276-81, 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**: 612-6, 1992.
- MORAES, J. Gastroenterologia I. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1987.
- MORELLO, J.P.; BOUVIER, M. Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. *Biochem. Cell. Biol.*, **74**: 449-57, 1996.

- MOUMMI, C.; GULLIKSON, G.W.; GAGINELLA, T. S. Effect of endothelin-1 on guinea pig gallbladder smooth muscle *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**: 549-553, 1992.
- MYERS, S.I.; BARTULA, L. Human cholecystitis is associated with increased gallbladder prostaglandin I₂ and prostaglandin E₂ synthesis. *Hepatology.*, **16**: 1176-9, 1992.
- MYERS, S.I.; CHEUNG, L.Y. Prostacyclin (PGI₂) biosynthesis and its effect on luminal fluid absorption in gallbladder. *Surg. Forum*, **229**: 230, 1984.
- NAKAHARA, S.; EMOTO, N.; MATSUO, M. Isolation of an alternative spliced variant of bovine ECE-2. *Proc. of Sixth International Conference on Endothelin*, Montreal, O3, 1999.
- NAMBI, P.; PULLEN, M.; CONTINO, L.C.; BROOKS, D.P. Upregulation of renal endothelin receptors in rats with cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, **187**: 113-6, 1990.
- NISHIYAMA, M.; TAKAHARA, Y.; MASAKI, T.; NAKAJIMA, N.; KIMURA, S. Pharmacological heterogeneity of both endothelin ETA- and ETB-receptors in the human saphenous vein. *Jpn. J. Pharmacol.*, **69**: 391-8, 1995.
- NUSSDORFER, G.G.; ROSSI, G.P.; MALENDOWICZ, L.K.; MAZZOCCHI, G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. *Pharmacol. Rev.*, **51**: 403-38, 1999.
- O'BRIEN, R.F.; ROBBINS, R.J.; MCMURTRY, I.F. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J. Cell Physiol.*, **132**: 263-70, 1987.
- OHUCHI, T.; TADA, K.; AKAMATSU, K. Endogenous ET-1 contributes to liver injury induced by galactosamine and endotoxin in isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.*, **268**: G997-G1003, 1995.
- OKAMOTO, Y.; NINOMIYA, H.; TANIOKA, M.; SAKAMOTO, A.; MIWA, S.; MASAKI, T. Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J. Biol. Chem.*, **272**: 21589-96, 1997.
- OPGENORTH, T.J.; ADLER, A.L.; CALZADILLA, S.V.; CHIOU, W.J.; DAYTON, B.D.; DIXON, D.B.; GEHRKE, L.J.; HERNANDEZ, L.; MAGNUSON, S.R.; MARSH, K.C.; NOVOSAD, E.I.; VON GELDERN, T.W.; WESSALE, J.L.; WINN, M.; WU-WONG, J.R. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ET_A-selective receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**: 473-481, 1996.
- OPGENORTH, T.J.; KIMURA, S.; WU-WONG, J.R. Characterization of endothelin-converting enzymes. *Meth. in Neurosci.*, **23**: 251-265, 1995.
- OZAKI, S.; OHWAKI, K.; IHARA, M.; ISHIKAWA, K.; YANO, M. Coexpression studies with endothelin receptor subtypes indicate the existence of intracellular cross-talk between ET(A) and ET(B) receptors. *J. Biochem.*, **121**: 440-7, 1997.
- PINZANI, M.; MILANI, S.; DE FRANCO, R.; GRAPPONE, C.; CALIGIURI, A.; GENTILINI, A.; TOSTI-GUERRA, C.; MAGGI, M.; FAILLI, P.; RUOCCO, C.; GENTILINI, P. Endothelin-1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, **110**: 534-548, 1996.

- PIOVEZAN, A.P.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P.; RAE, G.A. Endothelin-1-induced ET_A receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET_B receptor activation. *Brit. J. Pharmacol.*, **129**: 961-968, 2000.
- PITT, H.A.; KING, W.^{3RD}; MANN, L.L.; ROSLYN, J.J.; BERQUIST, W.E.; AMENT, M.E.; DENBESTEN, L. Increased risk of cholelithiasis with prolonged total parenteral nutrition. *Am. J. Surg.*, **145**: 106-12, 1983.
- PLUMPTON, C.; FERRO, C.J.; HAYNES, W.G.; WEBB, D.J.; DAVENPORT, A.P. The increase in human plasma immunoreactive endothelin but not big endothelin-1 or its C-terminal fragment induced by systemic administration of the endothelin antagonist TAK-044. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 311-4, 1996.
- POLLOCK, D.M.; KEITH, T.L.; HIGHSMITH, R.F. Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.*, **9**: 1196-204, 1995.
- RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. *Regul. Pept.*, **55**: 1-46, 1995.
- REICHEN, J.; GERBES, A.L.; STEINER, M.J.; SAGESSER, H.; CLOZEL, M. The effect of endothelin and its antagonist Bosentan on hemodynamics and microvascular exchange in cirrhotic rat liver. *J. Hepatol.*, **28**: 1020-1030, 1998.
- 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.
- RESINK, T.J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F.R. Activation of phospholipase A2 by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**: 279-86, 1989.
- REYNOLDS, E.; MOK, L.; KUROSAWA, S. Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 868-873, 1989.
- ROCHEVILLE, M.; LANGE, D.C.; KUMAR, U.; PATEL, S.C.; PATEL, R.C.; PATEL, Y.C. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, **288**: 154-7, 2000.
- ROCKEY, D.C.; CHUNG, J.J. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J. Clin. Invest.*, **98**: 1381-1388, 1996.
- ROCKEY, D.C.; FOUASSIER, L.; CHUNG, J.J.; CARAYON, A.; VALLEE, P.; REY, C.; HOUSSET, C. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology*, **27**: 472-80, 1998.
- ROOS, M.; SOSKIC, V.; POZNANOVIC, S.; GODOVAC-ZIMMERMANN, J. Post-translational modifications of endothelin receptor B from bovine lungs analyzed by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **273**: 924-31, 1998.
- ROTHERMUND, L.; LEGGEWIE, S.; SCHWARZ, A.; THONE-REINECKE, C.; CHO, J.J.; BAUER, C.; PAUL, M.; NEUMAYER, H.H.; SCHUPPAN, D.; HOCHER, B. Regulation of the hepatic endothelin system in advanced biliary fibrosis in rats. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**: 507-12, 2000.

- ROUBERT, P.; GILLARD, V.; PLAS, P.; GUILLON, J.M.; CHABRIER, P.E.; BRAQUET, P. Angiotensin II and phorbol-esters potently down-regulate endothelin (ET-1) binding sites in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 809-15, 1989.
- SAIDA, K.; MITSUI, Y.; ISHIDA, P. A novel peptide vasoactive intestinal contractor of new endothelin peptide family. *J. Biol. Chem.*, **264**: 14613-14616, 1989.
- 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.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**: 732-735, 1990.
- SALMON, J.A.; SMITH, D.R.; FLOWER, R.J.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Further studies on the enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide into prostacyclin by porcine aorta microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **523**: 250-62, 1978.
- SAVERYMUTTU, S.H.; WOOD, J.R.; MORTON, I.K. Animal maturity influences prostaglandin effects on gallbladder fluid transport and smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **60**: 7-14, 1979.
- SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Vascular biology of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **32(Suppl 3)**: S2-13, 1998.
- SCHILD, H. O. pA_x and competitive drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.*, **4**: 277-280, 1949.
- SCHJOLDAGER, B.; POULSEN, S.S.; SCHMIDT, P.; COY, D.H.; HOLST, J.J. Gastrin-releasing peptide is a transmitter mediating porcine gallbladder contraction. *Am. J. Physiol.*, **260**: G577-85, 1991.
- SCHOETZ, D.J.Jr; BIRKETT, D.H.; WILLIAMS, L.F.Jr. Gallbladder motor function in the intact primate: autonomic pharmacology. *J. Surg. Res.*, **24**: 513-9, 1978.
- SCHRAMEK, H.; WANG, Y.; KONIECZKOWSKI, M.; SIMONSON, M.S.; DUNN, M.J. Endothelin-1 stimulates cytosolic phospholipase A₂ activity and gene expression in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.*, **46**: 1644-1652, 1994.
- SERRADEIL-LE, G.C.; JOUNEAUX, C.; SANCHEZ-BUENO, A.; RAUFASTE, D.; ROCHE, B.; PREAUX, A.M.; MAFFRAND, J.P.; COBBOLD, P.H.; HANOUNE, J.; LOTERSZTAJN, S. Endothelin action in rat liver. Receptors, free Ca²⁺ oscillations, and activation of glycogenolysis. *J. Clin. Invest.*, **87**: 133-8, 1991.
- SHAFFER, E.A. Review article: control of gall-bladder motor function. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **14(Suppl 2)**: 2-8, 2000.
- SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M.; IKEDA, M.; TANZAWA, K. Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.*, **371**: 140-4, 1995.
- SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M.; TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18275-18278, 1994.

- SHRAGA-LEVINE, Z.; SOKOLOVSKY, M. Functional role for glycosylated subtypes of rat endothelin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**: 495-500, 1998.
- SHYAMALA, V.; MOULTHROP, T.H.; STRATTON-THOMAS, J.; TEKAMP-OLSON, P. Two distinct human endothelin B receptors generated by alternative splicing from a single gene. *Cell Mol. Biol. Res.*, **40**: 285-96, 1994.
- SIMONSON, M.S. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.*, **73**: 375-411, 1993.
- SIMONSON, M.S.; OSANAI, T.; DUNN, M.J. Endothelin isopeptides evoke Ca²⁺ signaling and oscillations of cytosolic free [Ca²⁺] in human mesangial cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1055**: 63-8, 1990.
- SINGH, V.; KUMAR, P.; RAI, H.S.; SINGH, K. Postcholecystectomy problems and the role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Br. J. Clin. Pract.*, **50**: 183-6, 1996.
- SIRVIÖ, M.L.; METSARINNE, K.; SAIJONMAA, O.; FYHRQUIST, F. Tissue distribution and half-life of ¹²⁵I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**: 1191-5, 1990.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical methods.*, Ames, Iowa State University Press, 1967.
- SNELL, R.S. *Histologia clínica.* Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.
- SOGNI, P.; MOREAU, R.; GOMOLA, A.; GADANO, A.; CAILMAIL, S.; CALMUS, Y.; CLOZEL, M.; LEBREC, D. Beneficial hemodynamic effects of bosentan, a mixed ET(A) and ET(B) receptor antagonist, in portal hypertensive rats. *Hepatology*, **28**: 655-9, 1998.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.*, **68**: 435-71, 1995.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmac. Ther.*, **54**: 129-149, 1992.
- STEPHENSON, K.; HARVEY, S.A.; MUSTAFA, S.B.; EAKES, A.T.; OLSON, M.S. Endothelin association with the cultured rat Kupffer cell: characterization and regulation. *Hepatology*, **22**: 896-905, 1995.
- STRAH, K.M.; MELENDEZ, R.L.; PAPPAS, T.N.; DEBAS, H.T. Interactions of vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin octapeptide on the control of gallbladder contraction. *Surgery*, **99**: 469-73, 1986.
- SUDJARWO, S.A.; MASATOSHI, H.; TANAKA, T.; MATSUDA, Y.; OKADA, T.; KARAKI, H. Subtypes of endothelin ET_A and ET_B receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**: 627-633, 1994.
- SUGAWARA, F.; NINOMIYA, H.; OKAMOTO, Y.; MIWA, S.; MAZDA, O.; KATSURA, Y.; MASAKI, T. Endothelin-1-induced mitogenic responses of Chinese hamster ovary cells expressing human endothelinA: the role of a wortmannin-sensitive signaling pathway. *Mol. Pharmacol.*, **49**: 447-57, 1996.
- SUNAKO, M.; KAWAHARA, Y.; HIRATA, K.; TSUDA, T.; YOKOYAMA, M.; FUKUZAKI, H.; TAKAI, Y. Mass analysis of 1,2-diacylglycerol in cultured rabbit vascular smooth muscle cells. Comparison of stimulation by angiotensin II and endothelin. *Hypertension*, **15**: 84-8, 1990.

- SUZUKI, N.; MATSUMOTO, H.; KITADA, C.; MASAKI, T.; FUJINO, M.A. Sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J. Immunol. Methods*, **118**: 245-50, 1989.
- SUZUKI, T.; HOSHI, N.; WATANABE, K.; KASUKAWA, R.; SUZUKI, T. Immunohistochemical localization of endothelin-1/big endothelin-1 in normal liver, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Fukushima J. Med. Sci.*, **44**: 93-105, 1998.
- TAKAI, S.; SHIOTA, N.; JIN, D.; MIYAZAKI, M. Chymase processes big-endothelin-2 to endothelin-2-(1-31) that induces contractile responses in the isolated monkey trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **358**: 229-233, 1998.
- TANAKA, A.; KATAGIRI, K.; HOSHINO, M.; HAYAKAWA, T.; TSUKADA, K.; TAKEUCHI, T. Endothelin-1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.*, **266**: G324-9, 1994.
- TASAKA, K.; KITAZUMI, K. The control of endothelin-1 secretion. *Gen. Pharmacol.*, **25**: 1059-69, 1994.
- THOMPSON, J.C.; FENDER, H.R.; RAMUS, N.I.; VILLAR, H.V.; RAYFORD, P.L. Cholecystokinin metabolism in man and dogs. *Ann. Surg.*, **182**: 496-504, 1975.
- TURNER, A.J.; BARNES, K.; SCHWEIZER, A.; VALDENAIRE, O. Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where? *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**: 483-6, 1998.
- UCHIDA, K.; YUZUKI, R.; KAMIKAWA, Y. Pharmacological characterization of endothelin-induced contraction in the guinea-pig oesophageal muscularis mucosae. *Br. J. Pharmacol.*, **125**: 849-57, 1998.
- VALDENAIRE, O.; LEPAILLEUR-ENOUF, D.; EGIDY, G.; THOUARD, A.; BARRET, A.; VRANCKX, R.; TOUGARD, C.; MICHEL, J.B. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 341-349, 1999.
- VAN KOPPEN, C.J.; NATHANSON, N.M. Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J. Biol. Chem.*, **265**: 20887-92, 1990.
- VIERHAPPER, H.; WAGNER, O.; NOWOTNY, P.; WALDHAUSL, W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation*, **81**: 1415-8, 1990.
- WANG, Y.; ROSE, P.M.; WEBB, M.L.; DUNN, M.J. Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ET_A or ET_B. *Am. J. Physiol.*, **267**: C1130-5, 1994.
- WATAKABE, T.; URADE, Y.; TAKAI, M.; UMEMURA, I.; OKADA, T. A reversible radioligand specific for the ET_B receptor: [125I]Tyr¹³-Suc-[Glu⁹,Ala¹¹,15]-endothelin-1(8-21), [125I]IRL 1620. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **185**: 867-73, 1992.
- WEBB, D.J. Endothelin: from molecule to man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **44**: 9-20, 1997.
- WEBB, D.J.; MONGE, J.C.; RABELINK, T.J.; YANAGISAWA, M. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**: 5-8, 1998.
- WEBB, M.L.; MEEK, T.D. Inhibitors of endothelin. *Med. Res. Rev.*, **17**: 17-67, 1997.

- WHITE, J.H.; WISE, A.; MAIN, M.J.; GREEN, A.; FRASER, N.J.; DISNEY, G.H.; BARNES, A.A.; EMSON, P.; FOORD, S.M.; MARSHALL, F.H. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*, **396**: 679-82, 1998.
- WOOD, J.R.; SAVERYMUTTU, S.H.; ASHBROOKE, A.B.; STAMFORD, I.F. Effects of various prostanoids on gallbladder muscle. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, **8**: 1569-71, 1980.
- WRIGHT, H.M.; MALIK, K.U. Prostacyclin formation elicited by endothelin-1 in rat aorta is mediated via phospholipase D activation and not phospholipase C or A₂. *Circ. Res.*, **79**: 271-6, 1996.
- WU-WONG, J.R.; CHIOU, W.J.; OPGENORTH, T.J. Phosphoramidon modulates the number of endothelin receptors in cultured Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Pharmacol.*, **44**: 422-9, 1993.
- WYPIJ, D.M.; NICHOLS, J.S.; NOVAK, P.J.; STACY, D.L.; BERMAN, J.; WISEMAN, J.S. Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem. Pharmacol.*, **43**: 845-853, 1992.
- XU, D.; EMOTO, N.; GIAID, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DEWIT, D.; YANAGISAWA, M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell*, **78**: 473-485, 1994.
- YANAGISAWA, H.; HAMMER, R.E.; RICHARDSON, J.A.; EMOTO, N.; WILLIAMS, S.C.; TAKEDA, S.I.; CLOUTHIER, D.E.; YANAGISAWA, M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J. Clin. Invest.*, **105**: 1373-82, 2000.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415, 1988.
- YASAR, U.; ERDEM, S.R.; TUNCER, M. Cyclosporine A preparations and their vehicles induce contraction of the guinea pig gallbladder in vitro: the role of cyclooxygenase metabolites. *Pharmacology*, **58**: 309-18, 1999.
- YOKOMORI, H.; ODA, M.; OGI, M.; KAMEGAYA, Y.; TSUKADA, N.; NAKAMURA, M.; ISHII, H. Enhanced expression of endothelin receptor subtypes in cirrhotic rat liver. *Liver.*, **21**: 114-122, 2001.
- YONEYAMA, T.; HORI, M.; MAKATANI, M.; YAMAMURA, T.; TANAKA, T.; MATSUDA, Y.; KARAKI, H. Subtypes of endothelin ET_A and ET_B receptors mediating tracheal smooth muscle contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**: 668-674, 1995.
- YOSHIMOTO, S.; ISHIZAKI, Y.; SASAKI, T.; MUROTA, S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke*, **22**: 378-83, 1991.