

RENATO DO REGO DE ARAUJO FARO

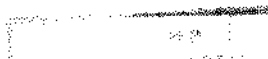
**PAPEL DOS RECEPTORES DE ENDOTELINA NA
CIRCULAÇÃO HEPÁTICA**

*Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas

1996



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DE FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F238p

Faro, Renato do Rego de Araújo

Papel dos receptores de endotelina na circulação hepática / Renato do Rego de Araújo Faro. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Gilberto de Nucci

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.



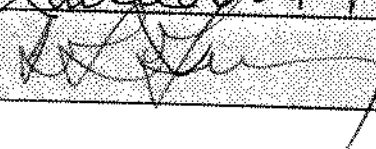
1. *Endotelina. 2. Vasoconstrição. 3. Hepática. I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci 
2. Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes 
3. Prof. Dr. Luiz Sergio Leonardo 

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/05/96

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia do Biólogo Renato do Rego de Araújo Faro.

Campinas, 17 de maio de 1996


Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -

À minha querida mãe, Marlene, que mesmo sozinha conseguiu criar seus três filhos e ensinar-nos os conceitos de respeito, honestidade, humildade e responsabilidade.

À minha esposa, Cris, que no decorrer deste árduo percurso acrescentou ao meu cotidiano o significado das palavras: paciência, dedicação, cumplicidade, carinho, família e amor.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, orientador desta tese, pelos momentos convividos onde além de conhecimentos trocados, a amizade e carinho estiveram sempre presentes.
- Ao Prof. Dr. Edson Antunes, co-orientador deste tese, pelo suporte técnico, dedicação e paciência de um amigo a todo momento que foi solicitado.
- Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, que com sua presença, amizade e alegria muito me ajudaram na elaboração desta tese.
- Ao Prof. Dr. Peter Withrington, pela participação no desenvolvimento desta tese, estando sempre presente nos momentos mais decisivos.
- Ao Dr. Timothy Warner, que me proporcionou o estágio na William Harvey Research Institute, em Londres, durante o ano de 1995, contribuindo para aumentar, ainda mais, o gosto pela pesquisa básica.
- À Dra. Ilka Boin, que com muita paciência e seriedade me ensinou a técnica necessária para a concretização desta tese
- Ao amigo, Rodrigo, por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer este grupo de pesquisa.
- À amiga Dora Maria Grassi Kassade, pelo auxílio na realização de boa parte desta tese e por mostrar-me como trabalhar com seriedade.

- Ao amigo Ronilson Agnaldo Moreno, pela acolhida amiga e sincera sempre presente a todos os momentos decisivos nesta jornada.
- À amiga Soraia Kátia Pereira Costa, pelos meses convvidos em Londres e pelo apoio em todos os momentos.
- Aos companheiros de pós-graduação, amigos de bons e maus momentos, sempre dispostos a colaborar para o enriquecimento desta tese: Aldete Zappellini, Áliter de Miranda Cará, Cléber Evandro Teixeira, Elen Landucci, Flávio do Rego de Araújo Faro (meu irmão), Heitor Moreno Júnior, Heloisa Helena de Araújo Ferreira, Heryck José Stella, José Luis Donato, Luciana Nathan, Luciana Bizeto, Marcelo Muscará, Marta Medeiros, Moacir Faria, Rogério Cardoso Castro, Sisi Marcondes e Welligton Ribeiro.
- Ao nosso administrador Paulo Sérgio de Oliveira, pela presteza, agilidade e paciência para atender a todos o mais rápido possível.
- Às secretárias do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pela eficiência e paciência: Maria das Dores Ponciano, Solange Basso e Gislaine E. Alípio.
- Aos auxiliares técnicos, pelo apoio indispensável: Aguinaldo Fernando de Azevedo, Airton Fernando de Paula e Miguel Borges da Silva.
- A Dra Lilian Mara Babadópulus pela imensa paciência com todos os pós-graduandos.
- Aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pela calorosa acolhida e agradável convivência durante estes anos.

“Se seus esforços forem vistos com indiferença, não desanime; também o Sol, ao nascer, dá um espetáculo todo especial e mesmo assim a maioria da platéia continua dormindo.”

(Eduardo Francisco Teixeira)

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de abreviações	xi
Lista de materiais e procedência	xii
Resumo	xiv

1 INTRODUÇÃO

1.1	Considerações Gerais	1
1.1.1	Anatomofisiologia do fígado	3
1.1.2	Fluxo sanguíneo através do fígado	4
1.1.3	Controle do fluxo sanguíneo hepático	5
1.1.4	Função do fígado como reservatório	6
1.1.5	Permeabilidade dos sinusóides hepáticos	6
1.2	Endotelina	8
1.3	Fator de relaxamento derivado do endotélio (Óxido Nítrico) ..	17
1.4	Objetivos	22

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1	Perfusão de fígado isolado	23
2.2	Dosagem de eicosanóides por radioimunoensaio	25
2.3	Deteção de hemoglobina por espectrofotometria	28
2.4	Eletroforese de proteína	29

2.5	Cálculos e análise estatística	32
3	RESULTADOS	
3.1	Efeitos da administração de endotelina-1, sarafotoxina S6b, IRL-1620 e noradrenalina no leito arterial hepático.....	33
3.2	Efeito da indometacina	36
3.3	Efeito do L-NAME	37
3.4	Efeito do antagonista seletivo de receptores ETA (FR 139317) sobre as respostas vasoconstritoras induzidas pelas ET-1, S6b e NA	40
3.5	Níveis basais de PGI2 e TXA2 no efluente venoso hepático	42
3.6	Liberação de prostaciclina pela ET-1, S6b e NA	42
3.7	Liberação de tromboxano pela ET-1, S6b e NA	44
3.8	Liberação de hemoglobina durante a administração IRL-1620, ET-1 e NA	45
4	DISCUSSÃO	50
5	CONCLUSÕES	56
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7	ABSTRACT	70

LISTA DE FIGURAS

Fig.	Pag.	Título
1	2	Esquema de um lóbulo hepático.
2	9	Homologia estrutural entre a endotelina-1 com as Sarafotoxinas.
3	10	Seqüência de aminoácidos das endotelinas.
4	12	Formação da endotelina.
5	15	Mecanismo de ação da endotelina.
6	25	Sistema de perfusão de fígado isolado.
7	35	Traçado representativo do perfil das respostas pressóricas de ET-1, S6b e NA.
8	38	Traçado experimental mostrando a potenciação provocada por indometacina e L-NAME.
9	39	Alterações da RVAH induzida pela ET-1, S6b e NA na presença de indometacina e L-NAME.
10	40	Efeito do FR 139317 sobre a RVAH.
11	41	Traçado experimental da pressão de perfusão na presença e ausência do antagonista FR 139317.
12	43	Efeito da indometacina sobre liberação de 6-oxo-PGF _{1α} .
13	44	Efeito da indometacina sobre a liberação de TXA ₂ .
14	47	Perfil colorimétrico de amostras de sangue e mostras provenientes do efluente venosos hepático durante administração de IRL-1620.
15	48	Perfil eletroforético de diferentes doses de IRL-1620.
16	49	Perfil eletroforético dos efluentes provenientes das injeções de NA, ET-1 e IRL-1620.

LISTA DE TABELAS

Tab.	Pag.	Título
1	26	Volumes usados para radioimunoensaio.
2	31	Volumes e soluções para preparo dos géis de eletroforese.
3	36	Efeito do IRL-1620 na PPAH antes e durante a infusão de indometacina.
4	37	Efeito do IRL-1620 na PPAH antes e durante a infusão concomitante de indometacina e L-NAME.
5	46	Concentração de oxihemoglobina antes e depois da administração de NA, ET-1 e S6b.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ECE	Enzima Conversora de Endotelina
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
ET	Endotelina
FR 139317	Ácido (R) 2-[(R)-2-[(S)-2-[[1-(hexahidro-1H-azepinil)]-carbonil]-amino-4-metilpetanoil]-amido-3-[3-(1-metil-1H-indolil)]-propionil]-amido-3-(2-piridil)-propiónico
PPAH	Pressão de Perfusão da Artéria Hepática
RVAH	Resistência Vascular da Artéria Hepática
Hb	Hemoglobina
INDO	Indometacina
IRL-1620	Suc-[Glu ⁹ ,Ala ^{11,15}]-Endothelina-1(8-21)
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
NA	Noradrenalina
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₃ OH	Hidróxido de amônio
NO	Óxido nítrico
Oxi-Hb	Oxi-hemoglobina
6-oxo-PGF _{1α}	6-oxo-prostaglandina F _{1α}
RIA	Radioimunoensaio
S6b	Sarafotoxina 6b
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	NNN-tetra metiletilenodiamido
Tris	Tris-[hidroximetil]-nitrometano
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
POPOP	1,4-di-(2-4-metil-5 feniloxazolil)-benzeno
PPO	2,5-difenil oxazol

LISTA DE MATERIAIS

Substância	Procedência
Ácido Clorídrico	Merck (Alemanha)
Acrilamida	Sigma (St Louis, EUA)
Azida sódica	Sigma (St Louis, EUA)
Azul de bromofenol	Sigma (St Louis, EUA)
Bicarbonato de sódio	Merck (Alemanha)
Cloreto de cálcio hexa hidratado	Merck (Alemanha)
Cloreto de potássio	Merck (Alemanha)
Dextrana	Sigma (St Louis, EUA)
Endotelina-1	Sigma (St Louis, EUA)
Fosfato de potássio	Merck (Alemanha)
Gelatina	Aldrich (St Louis, EUA)
Glicerol	Sigma (St Louis, EUA)
Glicina	Sigma (St Louis, EUA)
Glicose	Merck (Alemanha)
Heparina	Roche (São Paulo)
Hidróxido de amônia	Sigma (St Louis, EUA)
Indometacina	Sigma (St Louis, EUA)
IRL-1620	Peptide Institute (Osaka, Japão)
β -Mercaptoetanol	Sigma (St Louis, EUA)
N,N'-Metileno-bis-acrilamida	Sigma (St Louis, EUA)
N ^o -nitro-L-arginina metil éster	Sigma (St Louis, EUA)
(\pm)Noradrenalina	Sigma (St Louis, EUA)
6-oxo-PGF _{1α}	Sigma (St Louis, EUA)
Persulfato de amônio	Sigma (St Louis, EUA)

POPOP	Koch-Light Laboratories Ltd (Reino Unido)
PPO	Sigma (St Louis, EUA)
Sarafotoxina 6b	Sigma (St Louis, EUA)
Sagatal [®]	May & Baker (Dagenham, Reino Unido)
SDS	Sigma (St Louis, EUA)
Sulfato de magnésio hepta hidratado	Merck (Alemanha)
TEMED	Sigma (St Louis, EUA)
Tolueno	Labsynth (Diadema, SP)
Tris	Sigma (St Louis, EUA)
Triton X-100	Nuclear (São Paulo)
TXB ₂	Sigma (St Louis, EUA)

Doações

Anti-6-oxo-PGF _{1α}	J. Salmon (Wellcome Res.Lab., Reino Unido)
Anti- TXB ₂	J. Salmon (Wellcome Res. Lab., Reino Unido)
FR-139317	T. Opgenorth (Abbott Lab., EUA)

Compostos Radioativos

6-oxo-5,6,8,9,11,14,15 (n)-[3H]-PGF_{1α} (atividade específica 150 Ci/mmol)

5,6,8,9,11,12,14,15 (n)-[3H]-TXB₂ (atividade específica 140 Ci/mmol)

Ambos adquiridos junto a Amersham International (Bucks, Reino Unido).

Resumo

Os efeitos vasculares da endotelina-1 (ET-1), da sarafotoxina 6b (S6b) e o IRL-1620 foram investigados em leito arterial hepático isolado de cão antes e durante a infusão de inibidores da ciclo-oxigenase e da óxido nítrico sintetase (indometacina e L-NAME, respectivamente). Administrações de noradrenalina (NA) foram usadas como agente vasoconstritor controle em nossos experimentos. Após a retirada cirúrgica do órgão, a veia cava (porções abdominal e supra-diafragmática), veia porta e artéria hepática foram canuladas. O órgão foi perfundido através da artéria hepática e da veia porta com solução nutritiva de Krebs oxigenada e aquecida a 37°C. Injeções em bolus de ET-1 (0.4-400 pmol), S6b (0.4-400 pmol), IRL-1620 (40-1200 pmol) e NA (5-500 nmol) foram feitas através da artéria hepática e as respostas da preparação foram registradas em polígrafo. As administrações de ET-1 e S6b induziram uma resposta vasoconstritora dependente da dose e de longa duração, acompanhadas de liberação significativa de prostaciclina (PGI₂). A infusão de indometacina (5,6 µM) neste sistema tendeu a aumentar, porém não significativamente, as respostas vasculares induzidas por estes agonistas. A subsequente infusão de L-NAME (10 µM), potencializou a resposta vasoconstritora induzida tanto pela ET-1 quanto pela S6b (P<0.05). A infusão de IRL-1620 não produziu efeito significativo na resistência vascular arterial hepática mesmo na presença simultânea dos antagonistas. A infusão do antagonista seletivo para receptores ET_A (FR 139317; 0,3 µM), reduziu significativamente as respostas

vasoconstritoras induzidas por ET-1 e S6b, sem no entanto afetar a resposta induzida por NA. O IRL-1620 (mas não a ET-1) foi capaz de produzir uma liberação significativa de hemoglobina do circuito hepático, sem no entanto causar uma resposta pressórica importante. Isso sugere uma distribuição preferencial de receptores do tipo ET_B no leito venoso hepático. Estes resultados indicam que as respostas pressóricas do fígado isolado e perfundido de cão às administrações de ET-1 e S6b, que são medidas principalmente por ativação de receptores ET_A no leito arterial hepático são moduladas pela liberação acoplada de mediadores vasodilatadores incluindo a PGI₂ e o óxido nítrico (NO).

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

O fígado é a maior glândula do corpo e está situado obliquamente na superfície abdominal do diafragma. É mantido nesta posição, em parte, pela pressão exercida pelas outras vísceras e por sua íntima inserção ao diafragma.

Este órgão está recoberto por uma camada serosa externa e uma camada fibrosa mais profunda. A camada serosa recobre a glândula (exceto na inserção do pâncreas e na fissura portal) expandindo-se então para formar os ligamentos e o omento menor. A camada fibrosa é, em geral, delgada e emite lâminas para o interior dos ligamentos e trabéculas para o interior da glândula. Na fissura portal, esta camada é contínua e apresenta abundante tecido conjuntivo que circunda os vasos e ductos, e os acompanha nos espaços-porta. O fígado é formado por diversos lobos hepáticos variando o seu número de acordo com as espécies. O fígado é composto de parênquima e tecido intersticial. O parênquima é composto de lóbulos poligonais (Figura 1), que são mantidos unidos por pequena quantidade de tecido conjuntivo interlobular. Os lóbulos são compostos dos seguintes elementos: células hepáticas poligonais, retículo, canaliculo biliar, plexo de grandes capilares (denominados sinusóides) e uma veia central. A consistência do fígado é firme-elástica sendo, contudo, maleável, o que permite ao órgão adaptar-se *in situ* a seus arredores.

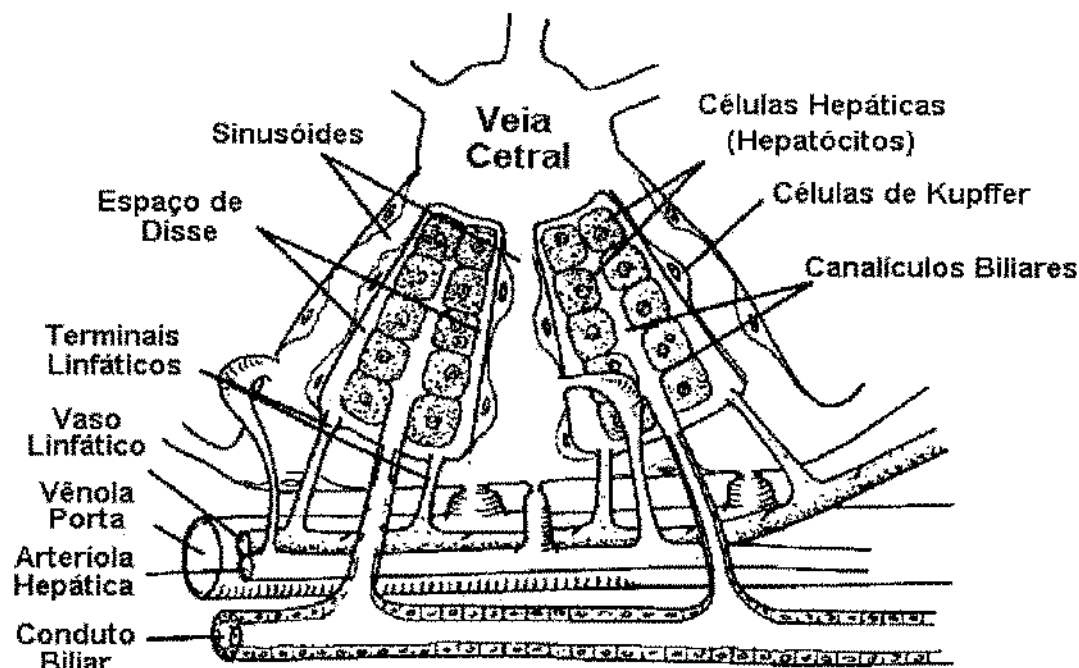


Figura 1 - Esquema de um lóbulos hepático (adaptado do Guyton - sétima edição).

A função mais aparente do fígado é a secreção da bile, embora numerosas outras funções sejam exercidas por este órgão. Assim, é um importante órgão de armazenamento de amido em forma de glicogênio, sintetizado a partir dos carboidratos que recebe do intestino, através da veia porta. É também capaz de armazenar gordura e proteína e executa funções secretórias através das quais sintetiza os produtos de decomposição de proteínas. Além disso, participa do sistema de depuração de hormônios e de drogas (mecanismo de primeira passagem).

1.1.1. Anatomofisiologia do fígado

A unidade funcional do fígado é o lóbulo hepático, que é uma estrutura cilíndrica com vários milímetros de comprimento e de 0,8 a 2 mm de diâmetro. O lóbulo hepático é constituído em torno de uma veia central, que se esvazia nas veias hepáticas e, posteriormente, na veia cava. O próprio lóbulo hepático é composto principalmente de lâminas hepatocelulares que se irradiam do centro para fora da veia central. Cada lâmina hepática tem geralmente a espessura de duas células e, entre as células adjacentes, encontram-se os pequenos canalículos biliares. Estes, que se esvaziam nos ductos biliares terminais, originam-se nos septos entre os lóbulos hepáticos adjacentes. No septo, pequenas vênulas porta recebem o sangue a partir da veia porta. A partir dessas vênulas, o sangue flui para os sinusóides hepáticos achatados e ramificados, que se situam entre as lâminas hepáticas. Assim, as células hepáticas estão continuamente expostas ao sangue venoso porta.

Observa-se também a presença de arteríolas hepáticas que estão presentes no septo interlobular. Estas irrigam os tecidos do septo e muitas das pequenas arteríolas esvaziam-se diretamente nos sinusóides hepáticos.

Os sinusóides venosos estão revestidos por dois tipos de células: a) as células endoteliais típicas; e b) as células de Kupffer, sendo estas capazes de fagocitar as bactérias e outros corpos estranhos presentes no sangue.

O revestimento endotelial dos sinusóides possui poros extremamente grandes com cerca de 1 mm de diâmetro. Abaixo deste revestimento, entre as células endoteliais e as células hepáticas, existe um espaço muito estreito, denominado de "*Espaço de Disse*". Devido à presença de grandes poros no endotélio, as substâncias presentes no plasma passam livremente para o Espaço de Disse. No septo interlobular também existe grande número de linfáticos terminais. Os Espaços de Disse ligam-se diretamente com os linfáticos de forma a que o excesso de líquido nos espaços é removido através dos linfáticos.

1.1.2. Fluxo sanguíneo através do fígado

Cerca de 1.100 ml do tecido de sangue circulam no fígado a cada minuto. O sangue flui através dos sinusóides hepáticos em íntimo contato com os cordões de células parenquimatosas hepáticas. A seguir, penetra nas veias centrais do fígado e, daí flui para a veia cava.

Além do fluxo sanguíneo portal, cerca de 350 ml de sangue invadem no fígado a cada minuto através da artéria hepática, perfazendo um total de aproximadamente 1.450 ml/min, que corresponde a aproximadamente 29% do débito cardíaco total. O fluxo sanguíneo arterial hepático mantém a nutrição do

tecido conjuntivo e especialmente das paredes dos canais biliares. Portanto, a redução no fluxo arterial hepático pode ser letal, pois quase sempre resulta em necrose das estruturas básicas do fígado.

1.1.3. Controle do fluxo sanguíneo hepático

Como menciona do anteriormente, $\frac{3}{4}$ do fluxo sanguíneo hepático provém da veia porta. O controle deste é feito por fatores que determinam o fluxo através do trato gastrintestinal e do baço, ou seja, quanto maior a atividade gastrintestinal, maior o fluxo hepático. Há também o controle nervoso do fluxo sanguíneo que se faz por estimulação dos nervos parassimpáticos que se dirigem ao estômago e ao cólon inferior. O $\frac{1}{4}$ restante do fluxo sanguíneo provém da artéria hepática sendo que o ritmo desse fluxo é determinado principalmente por fatores metabólicos locais do próprio fígado. Por exemplo, uma redução da concentração de oxigênio no sangue arterial acarreta um aumento no fluxo sanguíneo arterial hepático.

1.1.4. Função do fígado como reservatório

Como o fígado é um órgão distensível e compressível, grandes quantidades de sangue podem ser armazenadas em seus vasos sanguíneos. Em humanos, seu volume normal, incluindo o que se encontra nas veias e nos sinusóides hepáticos, é cerca de 500 ml. Entretanto, quando ocorre um aumento da pressão atrial direita (pressão retrógrada), o fígado distende-se e, ocasionalmente, pode conter 1 litro, ou seja, o dobro de sua capacidade normal. Isso ocorre principalmente na insuficiência cardíaca com congestão periférica. Assim sendo, o fígado é um grande órgão venoso distensível capaz de agir como valioso reservatório sanguíneo nos momentos em que existe um volume sanguíneo excessivo e capaz também de fornecer sangue extra na vigência de hipovolemia.

1.1.5. Permeabilidade dos sinusóides hepáticos

Como mencionado, os sinusóides hepáticos são revestidos por um endotélio semelhante ao dos capilares, porém a sua permeabilidade é significativamente maior. A pressão nos sinusóides não ultrapassa 8 mmHg de forma que a maioria das proteínas que saem do seu interior por difusão também retornam para seu interior pelo mesmo processo. Essa extrema permeabilidade dos sinusóides hepáticos faz com que os líquidos do sangue hepático tenham

um contato íntimo com as células parenquimatosas hepáticas, facilitando assim a permuta rápida de nutrientes entre o sangue e as células hepáticas.

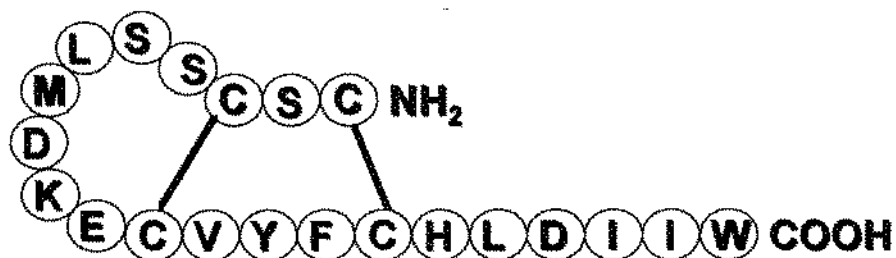
1.2. Endotelina

Durante estudos experimentais do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF/NO) de células endoteliais cultivadas de aorta de boi foi notado que tal sobrenadante produzia uma pequena vasoconstrição de longa duração em artérias coronárias de porcos ao invés do efeito relaxante esperado. Este fator de contração derivado do endotélio (EDCF) não foi atribuído a mediadores vasoconstritores conhecidos, mas sim a uma substância de origem peptídica (HICKEY *et al.*, 1985). Entretanto, somente com os estudos subseqüentes de GILLESPIE *et al.*, 1986 e O'BRIEN *et al.*, 1987, foi que estes resultados foram confirmados. Contudo, somente no final da década de 80, YANAGISAWA *et al.*, isolaram, purificaram e seqüenciaram este peptídeo (EDCT) e o denominaram "endotelina".

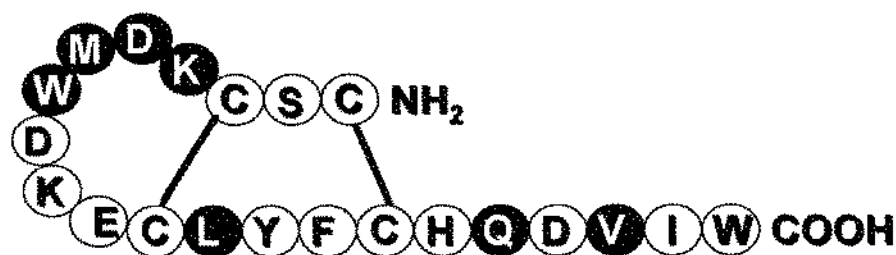
A endotelina-1 (ET-1) foi inicialmente isolada a partir de sobrenadantes de cultura de células endoteliais de aortas de porco (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Esta substância é composta por um peptídeo com 21 aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto que ligam em pares os resíduos de cisteína. A estrutura molecular deste peptídeo é incomum em mamíferos, mas normalmente encontrada em determinados grupos de toxinas que agem em canais de membranas tais como a apamina, a conotoxina, e as neurotoxinas de veneno de escorpião (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Posteriormente, demonstrou-se a

semelhança entre a seqüência de aminoácidos das toxinas do veneno de uma serpente rara (*Atractaspis engaddensis*) com a seqüência das endotelinas (TAKASAKI *et al.*, 1988; TAKASAKI *et al.*, 1991). Estas toxinas, denominadas sarafotoxinas S6, contêm 21 aminoácidos dos quais 14 se sobrepõem exatamente à seqüência de resíduos da ET-1 (Figura 2a) (INOUE *et al.*, 1989). Atualmente, existem descritas três isoformas de endotelina. Uma delas corresponde exatamente àquela primeiramente mencionada e, por esta razão, foi denominada ET-1. As outras duas formas, foram denominadas ET-2 e ET-3 (Figura 2b; INOUE *et al.*, 1989).

ET-1



S6b



S6c

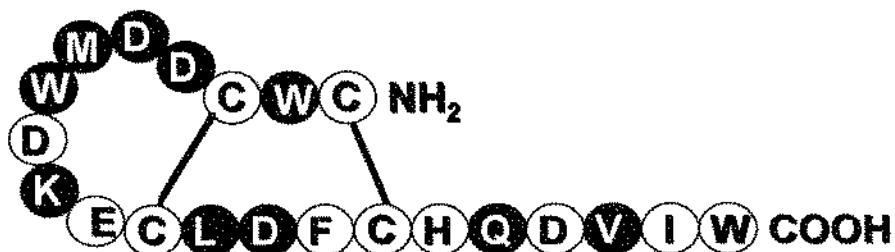
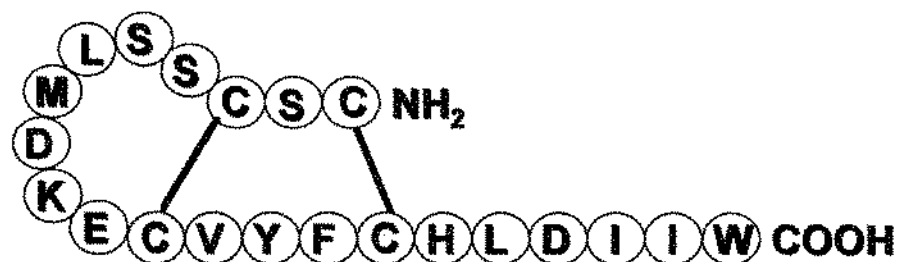
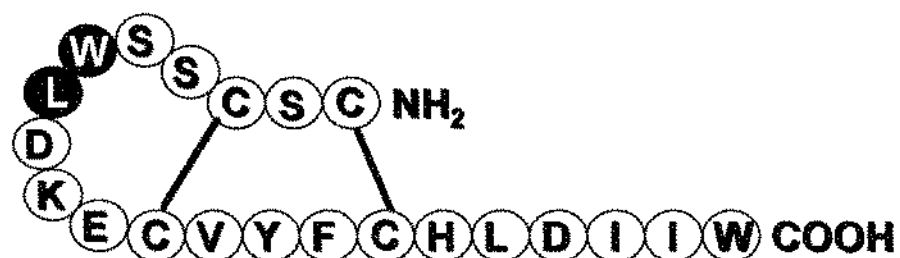


Figura 2 - Homologia estrutural entre a ET-1 e as sarafotoxinas.

ET-1



ET-2



ET-3

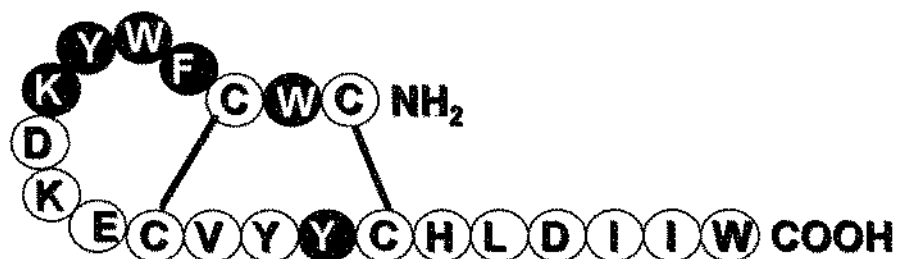


Figura 3 - Seqüência de aminoácidos das endotelinas 1, 2 e 3, respectivamente.

Além disto, uma outra seqüência de peptídeo foi descoberta por clonagem de genes de camundongo (SAIDA *et al.*, 1989) e, a este, foi dada a denominação de substância contrátil vasoativa intestinal (VIC) ou endotelina- β . Este peptídeo é costumeiramente descrito como ET-2, já que o RNAm que codifica este precursor é do mesmo tamanho do que codifica a ET-2 e bastante diferente dos precursores das ET-1 e ET-3 (BLOCH *et al.*, 1991).

A ET-1 é formada a partir de um precursor que contém 203 resíduos de aminoácidos denominado de preproendotelina (ppET-1), o qual é clivado por uma endopeptidase (específicas para aminoácidos básicos pareados) entre os resíduos de Arg-Arg e Lis-Arg (posição 92-93 da ppET-1 porcina e 91-92 da ppET-1 humana, respectivamente). A clivagem desta proteína origina a pró-endotelina ou "big endotelina", um produto intermediário contendo 39 resíduos de aminoácidos em porcos e 38 resíduos em humanos (YANAGISAWA *et al.*, 1988). A ET-1 origina-se a partir de uma clivagem proteolítica não usual entre os resíduos de Trp[21] e Val[22] da pró-endotelina, pela enzima conversora de endotelina (ECE - Figura 3). A pró-ET-1 e a ET-1 são equipotentes no que se refere ao aumento na pressão arterial *in vivo*. Porém, a pró-ET-1 possui somente 1% da potência da ET-1 no que se refere ao efeito contrátil em segmentos vasculares *in vitro* (KIMURA *et al.*, 1989). Isto mostra que a pró-ET-1 é rapidamente convertida a ET-1 *in vivo*, pela ação da ECE (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1990). Atualmente já foram clonadas duas ECEs sendo a primeira (ECE-1 - XU *et al.*, 1994; SHIMADA *et al.*, 1994) responsável pela conversão de pró-ET-1 em ET-1 o que ocorre a nível de membrana celular e a segunda (ECE-2 - EMOTO *et al.*, 1995) responsável pela conversão a nível intracelular. Isso vêm a esclarecer a diferença de potência das respostas da pró-ET-1 e ET-1 *in vitro* e *in vivo*.

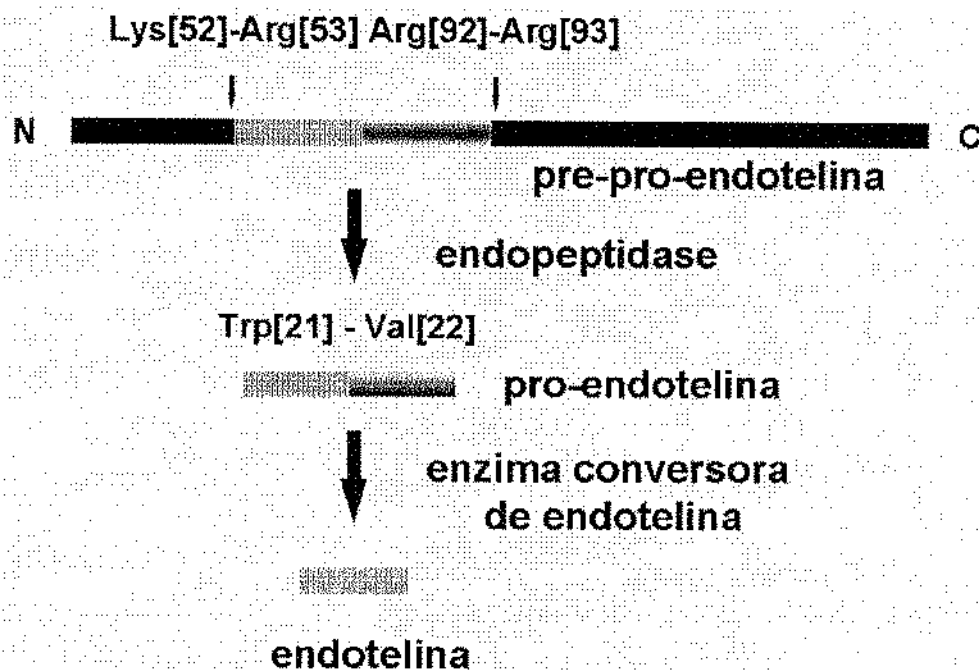


Figura 4 - Formação da endotelina a partir de um precursor de 203 aminoácidos.

Algumas substâncias tais como trombina, adrenalina e o ionóforo de cálcio A23187 aumentam a expressão do gene para a ppET (YANAGISAWA *et al.*, 1988), ou então promovem uma liberação lenta de ET-1 imunorreativa de cultura de células endoteliais. Em indivíduos sadios, os níveis plasmáticos detectados de ET-1 estão na faixa de pg/ml, tornando-se aumentados em algumas condições patológicas como, por exemplo, infarto do miocárdio (STEWART *et al.*, 1991a) e pré-eclâmpsia (TAYLOR *et al.*, 1990).

A ET-1 é o agente vasoconstritor mais potente descrito até a atualidade. A administração endovenosa deste peptídeo em ratos anestesiados e quimicamente desnervados induz uma resposta hipotensora breve seguida de

uma resposta pressora de longa duração (YANAGISAWA *et al.*, 1988; DE NUCCI *et al.*, 1988b; GARDINER *et al.*, 1990a; LE MONNIER DE GOUVILLE *et al.*, 1990; OHMAN *et al.*, 1990). Tal efeito também foi observado em outras espécies animais tais como gatos (MINKES *et al.*, 1990) e cães (GOETZ *et al.*, 1988). Entretanto, em cobaias só é observado a fase hipertensora (GRATTON *et al.*, 1995).

O efeito vasoconstritor induzido pela endotelina é mediado através de dois sistemas de transdução distintos: ativação de canais de cálcio (YANAGISAWA *et al.*, 1988; GOTO *et al.*, 1989; KASUYA *et al.*, 1989) e/ou ativação da fosfolipase C (ABDEL-LAFIT & ZHANG, 1991; HU *et al.*, 1990), os quais estão intimamente ligados à proteína G. Por outro lado, o efeito vasodilatador é devido à liberação de prostanóides (principalmente a prostaciclina (PGI₂) e a prostaglandina E₂ (PGE₂)) e EDRF/NO. Por estas evidências, acredita-se que os efeitos vasoconstritores induzidos pela ET-1 tanto *in vivo*, como em determinados leitos vasculares *in vitro*, tais como mesentério de rato (WARNER *et al.*, 1989a), baço e rins de coelho (RAE *et al.*, 1989) e fígado de cão *in situ* (WITHRINGTON *et al.*, 1989), sejam modulados pela liberação acoplada de EDRF/NO, PGI₂ e PGE₂, os quais limitam a amplitude e duração destas respostas.

Os efeitos biológicos das endotelinas são mediados por distintos tipos de receptores que estão distribuídos tanto nas células da musculatura lisa vascular como nas células endoteliais (DAVENPORT & MAGUIRRE, 1994). Estudos

autorradiográficos da distribuição de sítios ligantes para endotelina em tecidos de ratos demonstraram que estes sítios estão presentes nos glomérulos e papilas, alvéolos e brônquios, traquéia (tanto na camada muscular como também na camada de células epiteliais), glândulas adrenais, neurônios e camada mucosa do cólon, intestino e estômago (KOSEKI *et al.*, 1989).

Em mesentério isolado e perfundido de rato, a ET-3 age principalmente como vasodilatador, sendo mais ativa do que a ET-1. Por outro lado, neste mesmo sistema, a ET-1 age como um agente vasoconstritor muito mais potente. Esta diferença no perfil de ação destes dois tipos de endotelina levou WARNER *et al.* (1989a) a sugerirem que os receptores encontrados em células endoteliais e células musculares lisas fossem diferentes (Figura 4). A partir disso surgiram numerosos estudos com o objetivo de detectar os receptores de endotelina.

Hoje está plenamente estabelecida a existência de dois tipos de receptores de endotelina, denominados ET_A e ET_B (EMORI *et al.*, 1990; HARRISON *et al.*, 1992; KLOOG *et al.*, 1989). Contudo, há evidências da existência de um outro tipo de receptor de endotelina, denominado ET_C, identificado em melanócitos de sapos (*Xenopus laevis*) e específico para ET-3 (KARNE *et al.*, 1993), porém este tipo de receptor ainda não foi clonado em genomas mamíferos. A ET-1 e a ET-2 possuem afinidades elevadas e semelhantes para o receptor ET_A ao passo que a ET-3 apresenta pouca afinidade para este mesmo receptor. Todas as três isoformas são equipotentes em estimular o receptor ET_B (ARAI *et al.*, 1990; MOLENAAR *et al.*, 1993; SAKURAI *et al.*, 1990; SAKARAI *et al.*, 1992; SAKAMOTO *et al.*, 1991;

WATSON & GIRDLESTONE, 1993).

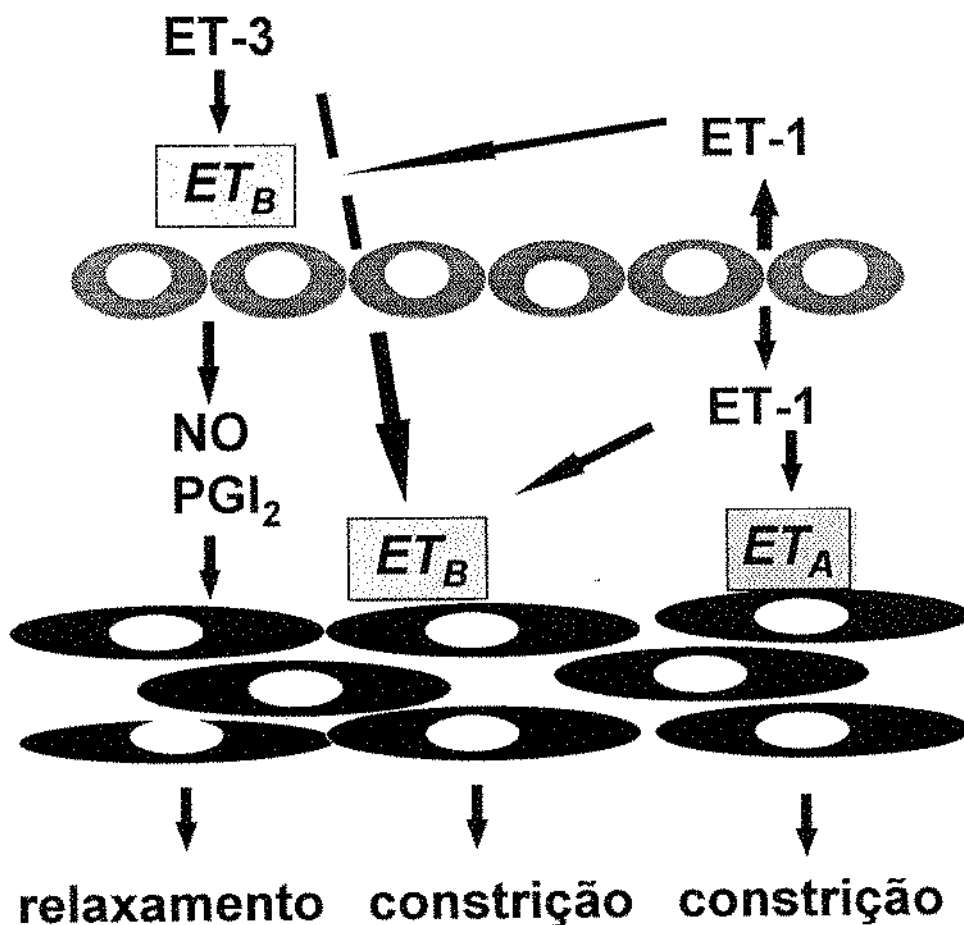


Figura 5 - Mecanismo de ação da endotelina.

Com isso, a vasodilatação de curta duração em resposta à ET-1 foi explicada como sendo decorrente da ativação do receptor ET_B, promovendo assim a liberação de fatores relaxantes (EDRF/NO e PGI₂). Concentrações mais elevadas de ET-1 causariam constrição sustentada através da ativação de receptores ET_A da musculatura lisa vascular. Atualmente, com o uso de agonistas e antagonistas seletivos para diferentes subtipos de receptores de

endotelina (MILLER *et al.*, 1993; WATSON & GIRDLESTONE, 1993), tem-se um conhecimento melhor destes sistemas.

No entanto, os estudos da endotelina na microcirculação hepática são escassos e pouco se sabe sobre a participação dos receptores neste sistema. Sabe-se que as células endoteliais sinusoidais hepáticas são capazes de produzir ET-1 quando estimuladas com TGF β (RIEDER *et al.*, 1991). Em fígado perfundido de rato *in situ*, injeções endovenosas de ET-1 causam vasoconstrição portal e aumento da glicogenólise (GANDHI *et al.*, 1990; SERRADEIL LE GAL *et al.*; 1991b; TRAN THI *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 1990a). Entretanto, este efeito desaparece com doses seguidas de ET-1, o que não ocorre com a vasoconstrição portal. Isto sugere a presença de mais de um tipo de receptor nesta resposta do leito vascular hepático.

1.3. Fator de relaxamento derivado do endotélio (Óxido Nítrico)

O reconhecimento do endotélio como fundamental no controle da homeostasia, em particular na regulação do tônus vascular é relativamente recente (FURCHGOTT, 1983; GRYGLEWSKY *et al.*, 1988). O endotélio é capaz de sintetizar dois potentes vasodilatadores e, ao mesmo tempo, inibidores da função plaquetária, a PGI₂ (MONCADA *et al.*, 1976) e o EDRF (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Ambas as substâncias são liberadas de maneira simultânea e acoplada em resposta a um mesmo estímulo (DE NUCCI *et al.*, 1988a).

Em 1980, FURCHGOTT & ZAWADZKI, investigando os efeitos da acetilcolina em vasos isolados, observaram que o relaxamento induzido por esse agonista, dependia da presença do endotélio. A acetilcolina, ao ativar os receptores muscarínicos localizados nas células endoteliais, promovia a liberação de uma substância que difundia-se para o músculo liso adjacente causando o relaxamento do vaso. Posteriormente, verificou-se que esta nova substância, o EDRF, era liberada também em resposta a outros mediadores tais como bradicinina, histamina, noradrenalina, angiotensina, serotonina, trombina, e outras (GRYGLEWSKI *et al.*, 1988). HECKER *et al.*, 1993, demonstraram que fatores físicos ("shear stress") também promovem a liberação de EDRF.

O reconhecimento do EDRF como NO foi baseado no fato de que, em tecidos vasculares, a atividade dos dois são similares (PALMER *et al.*, 1987 e

IGNARRO *et al.*, 1987). Além disso, as respostas a ambos os compostos são potenciadas pela enzima superóxido dismutase (GRYGLEWSKI *et al.*, 1986) e abolidas pela hemoglobina e pelo azul de metileno (GRUTTER *et al.*, 1981; MARTIN *et al.*, 1985b). Ambos induzem efeitos relaxantes na musculatura lisa vascular através da estimulação da guanilato ciclase solúvel, levando a um acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c; HOLZMANN, 1982; RAPPOPORT & MURAD, 1983) e a modificações de vários processos celulares dependente de GMP_c (LINCOLN & CORNWELL, 1991 e 1993). Além disto, causam inibição da agregação e, principalmente, da adesão plaquetária (RADOMSKI *et al.*, 1987a,b; SNEDDON & VANE, 1988); possuem meia vida semelhante e são estáveis em soluções ácidas (MURRY *et al.*, 1986).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado pelas células endoteliais a partir do nitrogênio guanido terminal do aminoácido L-arginina (PALMER *et al.*, 1988a,b; SCHMIDT *et al.*, 1988) tendo a L-citrulina como co-produto desta reação. As enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico (óxido nítrico-sintases-NOS) são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e são classificadas em dois tipos: constitutiva (dependente de cálcio e calmodulina; BREDT & SNYDER, 1990) e induzida (independente de cálcio; MARLETTA *et al.*, 1989).

O NO, por ser um gás hidrofóbico, difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com moléculas específicas. Dentre esses receptores, destaca-se o ferro, na sua forma reduzida (Fe²⁺), contido em

determinadas proteínas como, por exemplo, a guanilato ciclase. A ligação do NO ao grupamento heme da guanilato ciclase causa aumento drástico e imediato da sua atividade catalítica, o que resulta em aumento, de 50 a 200 vezes, na velocidade de formação de GMPc o qual, por sua vez, altera vários processos intracelulares, incluindo a ativação de canais de potássio via proteínas quinase dependentes de GMPc. Recentemente, BOLOTINA *et al.*, 1994, demonstraram que tanto o NO exógeno, como o EDRF nativo, são capazes de ativar diretamente canais de potássio dependentes de cálcio, por um mecanismo independente de GMPc.

A hemoglobina, contida nos eritrócitos, é outra molécula que contém o ferro na sua forma reduzida. Conseqüentemente, no momento em que o NO difunde-se da célula endotelial para o lúmen do vaso, o mesmo é rapidamente captado pelos eritrócitos. A reação com a hemoglobina, bem como com a oxihemoglobina, origina os nitratos (NO_3^-), os quais serão finalmente eliminados por filtração glomerular. Os nitritos (NO_2^-) também constituem produto da degradação do NO. No entanto, são rapidamente convertidos a nitratos, por meio de reação oxidativa a qual pode ser realizada pela própria oxihemoglobina.

Compostos estruturalmente análogos à L-arginina inibem competitivamente a NOS. Inicialmente, observou-se que a N^G-monometil L-arginina (L-NMMA) era capaz de inibir a síntese de NO e que este efeito caracterizava-se pelo fato de ser dependente da dose e específico para a forma

levógira (PALMER *et al.*, 1988; REES *et al.*, 1989). Posteriormente, outros inibidores foram sintetizados destacando-se a N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, MOORE *et al.*, 1990) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO, MULSCH & BUSSE, 1990).

A NOS constitutiva encontra-se sob a forma inativa até que a calmodulina, estimulada pelo cálcio, liga-se a essa enzima, ativando-a determinando uma liberação contínua de pequenas quantidades de NO. A NOS constitutivas subdividem-se em neuronal e endotelial, sendo a neuronal de peso molecular maior (168 kDa) e a liberação de NO oriunda de neurônios nitrérgicos; já a endotelial, com peso molecular menor (135 kDa) regula o tônus vascular, bem como a adesão e agregação plaquetária.

Ao contrário das NOS constitutiva, a forma induzível não é comumente encontrada. No entanto, à partir de determinados estímulos, tais como citoninas (interleucina-1, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ) e lipopolíssacarídeo, tanto células endoteliais, bem como musculares lisas, macrófagos, miócitos, hepatócitos dentre outras, são capazes de expressar uma forma induzível da NOS, expressão esta, que é inibida pelos glicocorticóides (MONCADA *et al.*, 1991). A NOS induzível, uma vez expressa, independe do complexo cálcio-calmodulina e libera grandes quantidades de NO por períodos relativamente prolongados.

Atualmente, acredita-se que a NOS constitutiva esteja relacionada à modulação de parâmetros fisiológicos, enquanto a NOS induzível estaria mais

relacionada aos processos patológicos (PETROS *et al.*, 1994). Neste sentido, agentes que inibissem seletivamente as diferentes isoformas de NOS poderiam ser de grande valor terapêutico. Recentemente, algumas isotiouréias, compostos não análogos à L-arginina, vêm sendo descritas como inibidores mais seletivos da NOS induzível (SOUTHAN *et al.*, 1995).

1.4. Objetivos

Frente ao exposto, esta tese tem por objetivos:

1- Investigar os efeitos da ET-1 (agonista de receptores ET_A e ET_B), S6b (agonista preferencialmente para receptores ET_A) e IRL-1620 (agonista seletivo de receptores ET_B) no leito arterial e caracterizar os receptores envolvidos.

2- Demonstrar a participação dos prostanóides (PGI₂ e TXB₂) e do EDRF/NO na resposta pressórica da musculatura lisa hepática induzidas pela ET-1, S6b e IRL-1620.

3- Verificar a capacidade dos agonistas ET-1, S6b e IRL-1620 em liberar hemoglobina do circuito hepático.

2. Materiais e Métodos

2.1. Perfusão de Fígado Isolado

Os experimentos foram realizados em cães de ambos os sexos (10.8 ± 1.3 Kg), mantidos no Biotério Central da UNICAMP.

Os animais foram anestesiados pela veia braquial com pentobarbital sódico (Sagatal[®], 30 mg/Kg). Após laparotomia mediana total (do apêndice xifóide até o osso púbico), a veia cava inferior, a artéria hepática e a veia porta foram identificadas e isoladas. Todas as conexões de outros tecidos (estômago, pâncreas e linfonodos) com o fígado foram isoladas e ligadas. Após o completo isolamento de todas as estruturas em contato com o fígado, foi administrada heparina (5000 UI/animal) por via endovenosa para minimizar a formação de coágulos sanguíneos na região hepática. Em seguida, foi efetuada toracotomia, com abertura do pericárdio e exposição da porção supradiafragmática da veia cava inferior, sendo esta por sua vez também isolada. Após o completo isolamento do fígado, foram efetuadas as ligaduras necessárias para a remoção do órgão, obedecendo a seguinte seqüência: a) veia cava inferior (porção abdominal); b) artéria hepática; c) veia porta e d) veia cava inferior (porção supradiafragmática).

A artéria hepática e a veia porta foram canuladas e o órgão perfundido usando-se duas bombas de perfusão Watson Marlow sob fluxo constante total

(44.2 ± 4.1 ml/min), com solução oxigenada (95% O₂ + 5% CO₂) e aquecida (37°C) de Krebs. A porção supradiaphragmática da veia cava inferior foi utilizada para coleta de efluentes. Ao circuito arterial hepático foi acoplado um transdutor de pressão (modelo PRC 21/3, Ugo Basile) conectado a um registrador de dois canais (Gemini, modelo 7070) para medida da pressão de perfusão arterial hepática (PPAH; Figura 5). As alterações obtidas na resistência vascular arterial hepática (RVAH) foram calculadas utilizando a relação $(E-C/C) \times 100$, onde "C" expressa o valor da pressão de perfusão imediatamente antes da administração de qualquer droga e "E" expressa o valor da pressão de perfusão durante o efeito máximo obtido. Com isso, o valor representado por RVAH é expresso em % de alteração em relação ao valor controle preexistente (RICHARDSON & WITHRINGTON, 1976).

As drogas utilizadas nos experimentos foram diluídas em Krebs imediatamente antes de seu uso. As concentrações de noradrenalina (NA, 5 - 500 nmol), ET-1 (0,4 - 400 pmol), S6b (0,4 - 400 pmol) e IRL-1620 (200 - 1200 pmol) foram administrados através de *bolus* com volume constante igual a 1,0 ml mais 0,5 ml para a limpeza do sistema, perfazendo um total de 1,5 ml. As infusões dos antagonistas (indometacina, L-NAME e FR 139317) foram efetuadas através de ambos os leito (arterial e venoso) durante um período de 15 min., só após este tempo é que foram iniciadas as novas administrações.

A composição da solução de Krebs foi (em mM): NaCl 118; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,17; CaCl₂.6H₂O 2,5 e glicose 5,6.

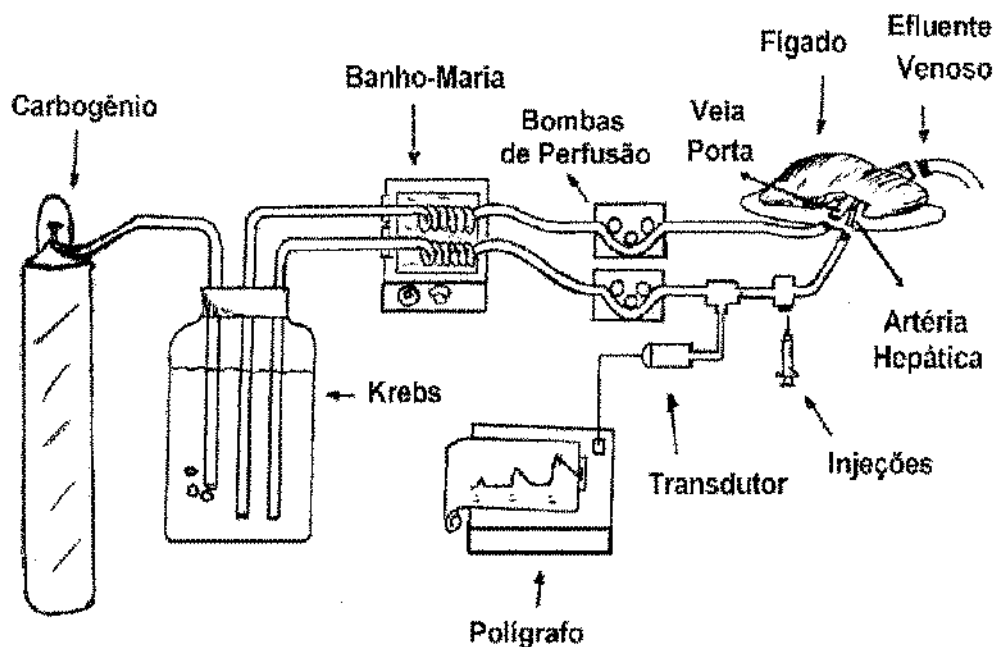


Figura 6 - Sistema de perfusão de fígado isolado usado em nossos experimentos.

2.2. Dosagem de eicosanóides por radioimunoensaio

Amostras provenientes do efluente venoso foram coletadas pela veia cava inferior supradiaphragmática durante um período fixo de 15 segundos imediatamente antes e após (5, 90 e 180 seg.) a administração de noradrenalina, endotelina-1, sarafotoxina 6b e IRL-1620. A concentração dos eicosanóides foi determinada por radioimunoensaio (SALMON *et al.*, 1978), sem extração prévia. As concentrações de TXA₂ e PGI₂ foram analisadas através de

seus produtos de degradação, TXB₂ e 6-oxo-PGF_{1α}, respectivamente. As substâncias e quantidades utilizadas para o radioimunoensaio estão representadas abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Volumes usados para preparo do radioimunoensaio (μl).

	Tampão	Padrões / Amostras	Anti-soro	(³ H)	Dextrana / Carvão
Totais	500	-	-	100	-
N.S.B	300	-	-	100	200
Zero	200	-	100	100	200
Padrão	100	100	100	100	200
Amostra	100	100	100	100	200

Os "totais" representam a quantidade máxima de radioatividade do prostanóide e o "N.S.B." (*non-specific binding*) representa a ligação não-específica do prostanóide (³H) ao carvão. A amostra "Zero" (*Zero binding*) representa a estabilidade da ligação do mesmo prostanóide na ausência de padrões ou amostras. O RIA foi feito conforme descrito a seguir.

Anti-soros provenientes de coelho foram diluídos (1:1000 - 1:2000) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) contendo gelatina (0,1%) e azida sódica (NaN₃; 0,1%). Alíquotas de 0,1 ml dos anti-soros foram misturadas com os padrões ou amostras em tubos de ensaio de vidro (10 x 75 mm). O eicosanóide

marcado (^3H) diluído em tampão tris-gelatina (0,1 ml contendo aproximadamente 10.000 dpm) foi imediatamente adicionado ao tubo e o volume total da reação foi completado para 0,4 ml com tampão Tris. Após completar o volume, as amostras foram misturadas e incubadas à 4°C por um período que variou de 8-24 h. Para a remoção do material marcado não ligado do anti-soro, adicionou-se uma mistura de carvão ativado e dextrana (0,2 ml de tampão tris-HCl, contendo 4 mg de carvão e 0,8 mg de dextrana) a cada tubo, exceto aos dois primeiros. A seguir, foram agitados por 10 segundos e novamente incubados por mais 10 min. Os tubos permaneceram imersos em camada de gelo durante todo o experimento. Terminado este período de incubação, os tubos foram centrifugados a 2000 g durante 15 min em centrífuga refrigerada (Hermle, modelo Z-260 K). O sobrenadante contendo o complexo antígeno-anticorpo foi vertido para frascos de cintilação e a estes foram adicionados 4,5 ml do líquido de cintilação (PPO 0,4 g + POPOP 4,0 g + Triton X-100 333 ml + tolueno 667 ml). A radioatividade foi determinada em um espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman LS-150). Foram utilizados controles externos para verificação da validade do ensaio.

2.3. Detecção de hemoglobina por espectrofotometria

As amostras do efluente venoso foram coletadas pela veia cava supradiaphragmática em períodos semelhantes ao descrito anteriormente e utilizadas para a detecção de hemoglobina (Hb). A dosagem da hemoglobina foi realizada pelo método da oxihemoglobina (oxi-Hb), técnica que consiste na conversão e estabilização da Hb para oxi-Hb através da adição de hidróxido de amônia (NH₃OH 50%) à amostra.

A partir de uma amostra de sangue humano de 15,1 g/dl de Hb (obtida junto ao Laboratório de Hematologia da UNICAMP), foram feitas diluições sucessivas 1:2 em solução isotônica de salina 0.85%, obtendo-se assim diluições de 15,1 a 0,115 g/dl. Estas concentrações de Hb foram novamente diluídas 1:250 em água destilada e *uma gota* de NH₃OH 50% foi adicionada a 5,0 ml de cada concentração de Hb para, em seguida, serem analisadas em espectrofotômetro (Uvicon modelo 810) com varredura de 340 a 620 nm. Após a análise, procedeu-se a leitura no maior pico de liberação (540 nm) contra um branco constituído por água destilada. Com os resultados obtidos pela diferença colorimétrica entre as amostras e o branco, foi possível a construção de uma curva de calibração e a obtenção de um fator de correção igual a 31,65.

Para a obtenção dos valores de Hb, multiplicou-se os valores das densidades ópticas das amostras por um fator final resultante da equação abaixo, fator este igual a 126,6.

$$\text{Fator Final de Multiplicação} = \frac{\text{Fator de Correção}}{\text{Fator de diluição dos padrões}} \times 1000$$

Onde 1000, é o fator de conversão de g/dl para mg/dl.

Com isso, os valores finais das densidades ópticas das amostras foram expressos em mg/dl.

2.4. Eletroforese de proteína

A eletroforese de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato de sódio) segundo o método de LAEMLI (1970), utilizando-se sistema descontínuo dissociante em placa vertical. O gel de resolução com concentração de poliacrilamina de 12% foi preparado sob 1,5 cm de gel de empacotamento (3,75% de acrilamida), misturando-se as soluções estoque nas proporções apresentadas. (Tabela 2).

Para o preparo das amostras e do sangue total, tanto humano como do cão, foi utilizado tampão dissociante (tris-HCl 63 mM, pH 6,8, contendo 2-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 5% e azul de bromofenol 0.001%). Após

diluição, as amostras foram aquecidas à 100°C durante 4 minutos. Uma amostra contendo proteínas de pesos moleculares conhecidos (Sigma-Dalton Mark VI) foi utilizada para estimativa e confirmação do peso molecular das proteínas, segundo método de SVASTI e PANIJPAN (1977).

Aliquotas de 25 µl das amostras totais e de sangues foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi conduzida em temperatura ambiente com voltagem fixada em 100 V (40 - 25 mA), até o azul de bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel (aproximadamente 90 minutos).

Tabela 2 - Soluções estoque para preparo dos géis de eletroforese em sistema descontínuo dissociante (ml)

Soluções Estoques	Gel de empacotamento	Gel de resolução 12%	Tampão cuba
acrilamida 30% +			
bisacrilamida 0.8%	2,5	12	--
Tris-HCl 0,5 M			
pH 6,8	5,0	--	--
Tris-HCl 3,0 M			
pH 8,8	--	3,75	--
Tris 0,25 M +			
Glicina 1,92 M +	--	--	100
SDS 1% pH 8,3			
SDS 10%	0,2	0,3	--
Persulfato de			
amônio 3%	1,0	1,5	--
Água destilada	11,3	12,4	900
TEMED (NNN-tetra-			
metil etileno diamino)	0,015	0,015	--
Volume Final (aprox.)	20	30	1.000

2.5. Cálculos e análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias \pm erro padrão das médias (S.E.M.) e o "n" indica o número de experimentos realizados. Os resultados foram analisados pelo teste "t" Student pareado ou não-pareado. A significância foi considerada ao nível de 5%.

Os valores da pressão de perfusão arterial hepática e da resistência vascular arterial estão expressos como mmHg e percentual de alteração (%), respectivamente.

A liberação de eicosanóides está expressa pelo total de liberação, multiplicado pelo valor do volume coletado menos a quantidade liberada em condições basais, corrigidas também pelo volume da amostra. A liberação de hemoglobina seguiu o mesmo critério.

3. Resultados

O peso dos fígados foi de 452.1 ± 61.5 g representando 4.2 ± 0.3 % do peso corporal dos animais utilizados. O fluxo, somatório do fluxo arterial e portal, foi de 44.2 ± 4.1 ml/min, o que correspondeu a uma pressão de perfusão arterial hepática de 24.1 ± 1.9 mmHg. A média calculada para a resistência vascular arterial hepática foi de 0.6 ± 0.1 mmHg/(ml/min.).

3.1. Efeitos da administração de endotelina-1, sarafotoxina S6b, IRL-1620 e noradrenalina no leito arterial hepático

Endotelina-1 A Figura 6 mostra que a administração intra-arterial de ET-1 (0.4-400 pmol, n=7) resultou em um aumento dose-dependente da pressão de perfusão arterial (vasoconstrição). O efeito vasoconstritor evocado por este peptídeo foi de longa duração e não foi acompanhado por uma vasodilatação prévia.

Sarafotoxina S6b De modo similar à ET-1, a administração intra-arterial de sarafotoxina S6b (0.4-400 pmol, n=6) resultou em uma vasoconstrição dose-dependente e de longa duração do leito arterial hepático (Figura 6). Também não foi observado, em nenhum momento, o efeito vasodilatador.

IRL-1620 A administração intra-arterial do agonista seletivo para receptores ET_B , IRL-1620 (200-1200 pmol, n=6), não causou alterações significativas na pressão de perfusão da artéria hepática (0.4 ± 0.4 , 0.4 ± 0.4 e 0.6 ± 0.4 e 1.6 ± 0.5 mmHg para 200, 400, 1000 e 1200 pmol, respectivamente; n=5-6).

Noradrenalina Em vinte e um experimentos, a noradrenalina (NA) foi administrada pela artéria hepática em doses crescentes de 5 a 500 nmol. Os resultados mostraram que a mesma induz um aumento dependente da dose e de curta duração na pressão de perfusão arterial (Figura 6).

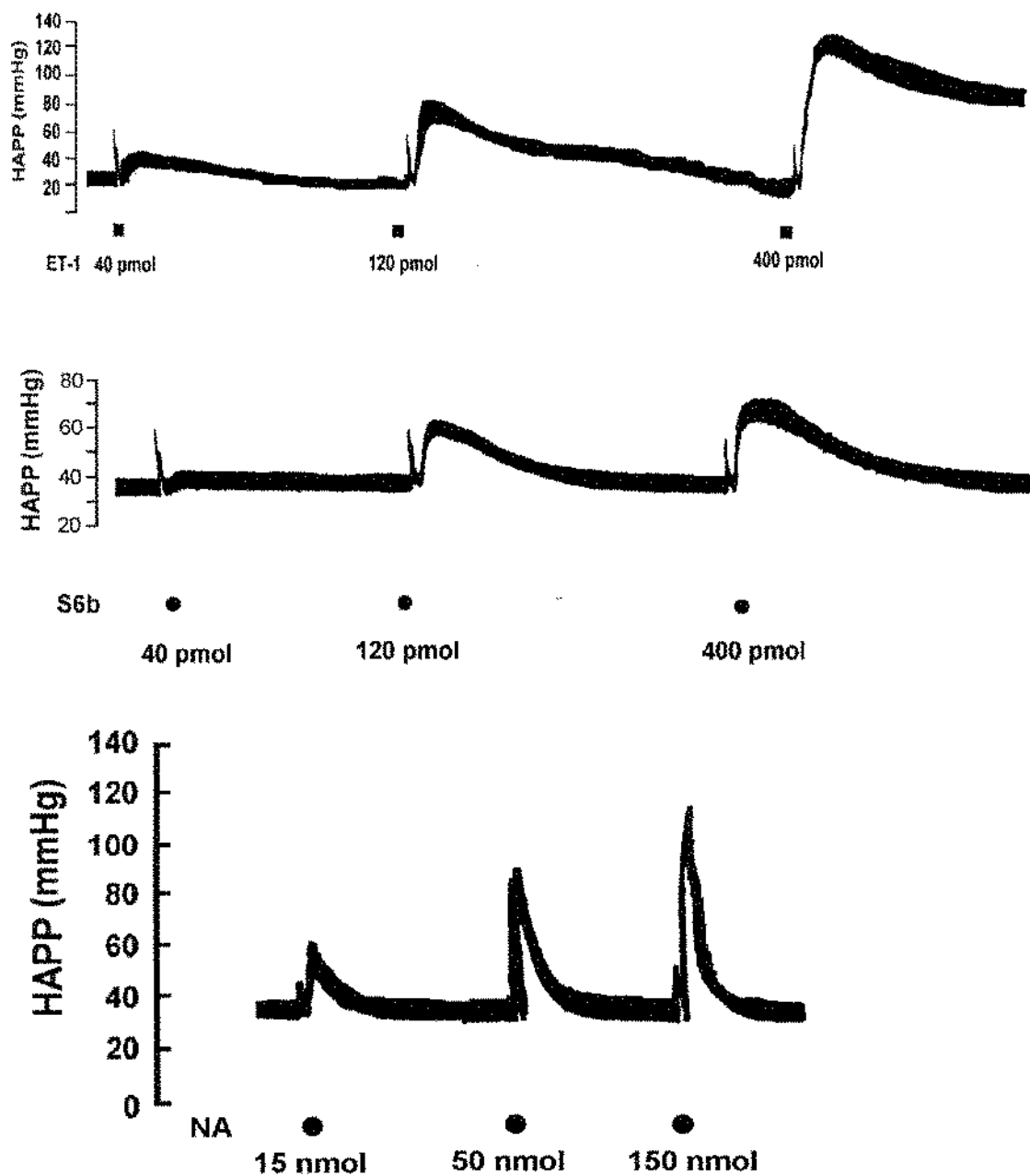


Figura 7 - Traçado experimental representando o perfil das respostas pressóricas de endotelina-1 (ET-1; painel superior), sarafotoxina 6b (S6b; painel central) e noradrenalina (NA; painel inferior) no circuito arterial hepático. Resultados semelhantes foram obtidos em outros experimentos.

3.2. Efeito da Indometacina

A infusão de indometacina (5,6 μ M) não refletiu em aumento significativo na PPAH (30.1 ± 2.4 e 30.8 ± 2.4 mmHg, antes e durante a infusão com indometacina, respectivamente, n=13). Da mesma forma, o fluxo venoso hepático também não foi significativamente alterado pela indometacina (44.8 ± 1.3 e 46.9 ± 1.5 ml/min, antes e durante a infusão de indometacina, respectivamente, n=13).

A presença da indometacina no circuito hepático causou um aumento discreto, mas não significativo das respostas vasoconstritoras induzidas por NA e ET-1 (Figuras 7). Todavia, causou um aumento significativo ($P < 0.05$) da resposta induzida pela maior dose de S6b (400 pmol; Figura 8). A resposta vascular do IRL-1620 não foi modificada significativamente na presença de indometacina (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do IRL-1620 na pressão de perfusão arterial hepática (mm/Hg), antes e durante a infusão de indometacina (5,6 μ M). Os valores estão expressos como média \pm S.E.M. (n= 5-6).

Doses	antes	durante
200 pmol	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.2
400 pmol	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.2
1000 pmol	0.6 ± 0.4	1.2 ± 0.5
1200 pmol	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.3

3.3. Efeito do L-NAME

A infusão concomitante de L-NAME (10 μ M) e indometacina não alterou de modo significativo a pressão de perfusão arterial hepática (34.3 ± 3.4 e 34.4 ± 3.7 mmHg, pressão basal antes e durante a infusão com L-NAME, respectivamente, n=10-13) e o fluxo venoso hepático (48.4 ± 1.4 e 46.9 ± 2.5 ml/min, antes e durante a infusão com L-NAME, respectivamente, n=10-13). Entretanto, o L-NAME causou um aumento significativo ($P < 0.05$) das respostas vasoconstritoras induzidas por ET-1 (Figura 7 e 8), S6b e NA, no leito arterial hepático (Figura 8). Mesmo na presença de indometacina e L-NAME, o IRL-1620 não apresentou efeitos significantes sobre a pressão de perfusão basal. (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito do IRL-1620 na pressão de perfusão arterial hepática, antes e durante da infusão concomitante de indometacina (5.6 μ M) e L-NAME (10 μ M). Os valores estão expressos como média \pm S.E.M. (n= 5-6).

Doses	antes	durante
200 pmol	0.2 ± 0.2	0 ± 0
400 pmol	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.3
1000 pmol	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.3
1200 pmol	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0.3

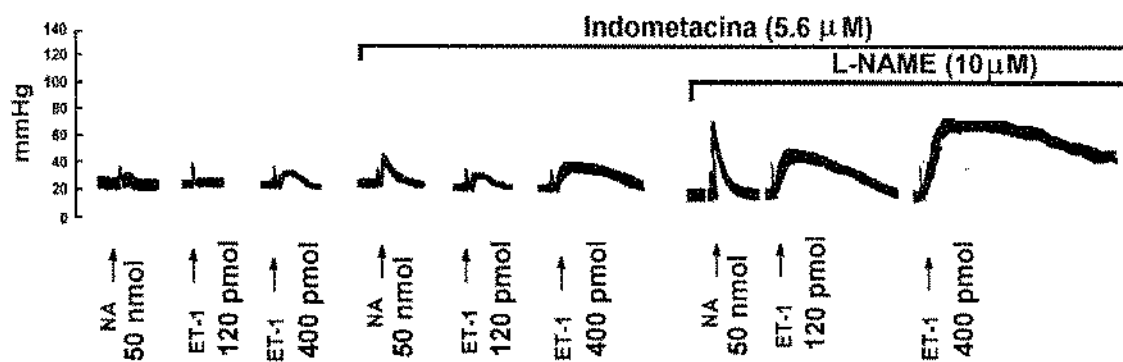


Figura 8- Traçado experimental da pressão de perfusão arterial hepática mostrando a potenciação das respostas vasoconstritoras induzidas por NA (50 nmol) e ET-1 (120 e 400 pmol), na ausência e presença de indometacina (5,6 μM) e L-NAME (10 μM).

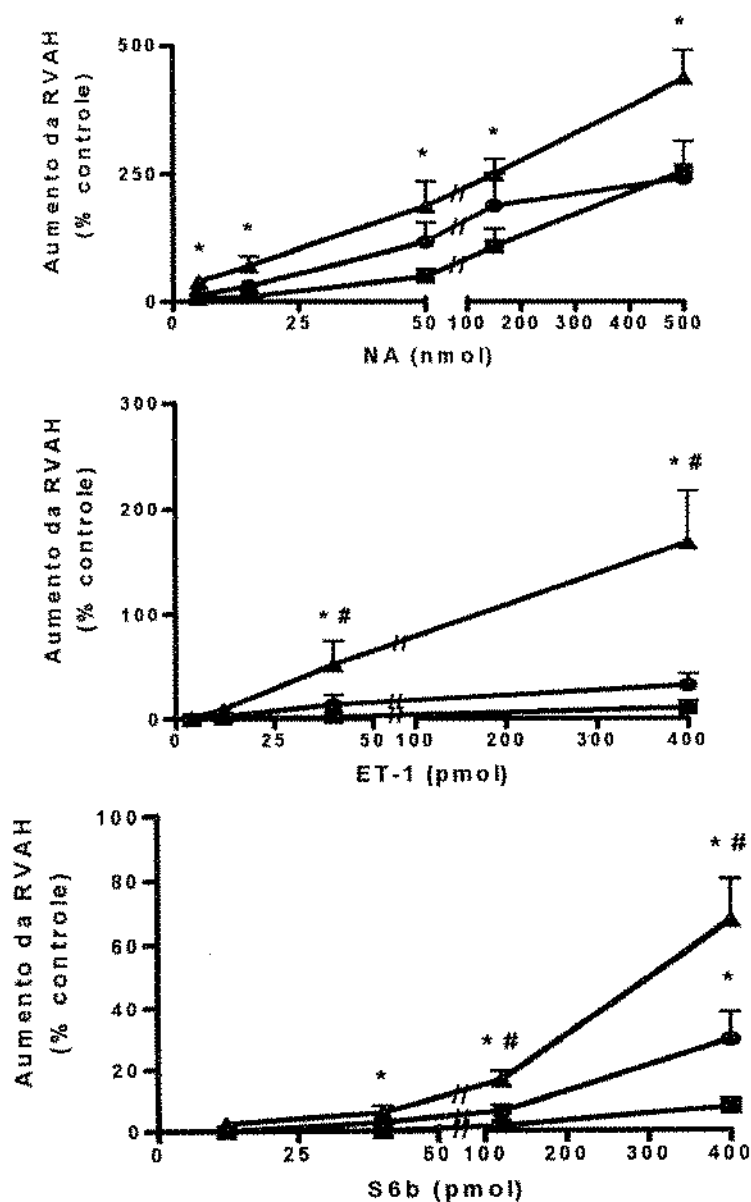


Figura 9 - Alterações da resistência vascular arterial hepática (RVAH) induzida pela noradrenalina (NA; painel superior), endotelina-1 (ET-1; painel do meio) e sarafotoxina 6b (S6b; painel inferior) na ausência (■) ou presença de indometacina (●) e indometacina e L-NAME (▲). *P<0.05, em relação aos valores controles na ausência dos inibidores. #P<0.05, em relação aos valores na presença de indometacina.

3.4. Efeito do antagonista seletivo de receptores ET_A (FR 139317) sobre as respostas vasoconstritoras induzidas pelas ET-1, S6b e NA.

A infusão intra-arterial de FR 139317 (0,3 μ M) não alterou a pressão de perfusão arterial (37.3 ± 6 e 36.9 ± 5.3 mmHg, antes e durante a infusão do FR 139317, respectivamente, $n=11$). Nesta concentração, o FR 139317 reduziu significativamente ($P<0.01$) o aumento da resistência arterial hepática induzido por ET-1(400 pmol) e S6b (400 pmol) sem, no entanto, afetar a resposta induzida pela NA (150 nmol; Figura 9).

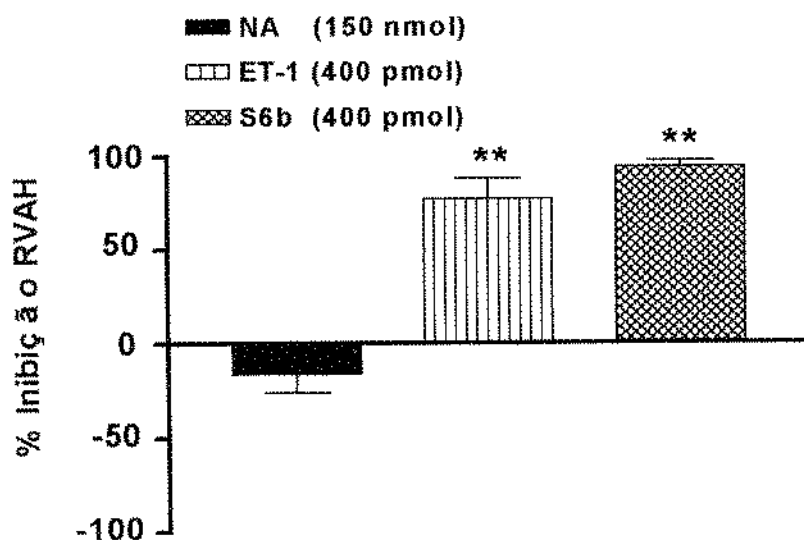


Figura 10 - Efeito do antagonista FR 139317 (0,3 μ M) sobre a resistência vascular arterial hepática induzida por ET-1 (400 pmol), S6b (400 pmol) e NA (150 nmol), antes (colunas pretas) e depois (colunas quadriculadas) da infusão do antagonista. ** $P<0.01$.

Contudo, trinta minutos após o término da infusão do FR 139317 sobre a circulação hepática, foi observado um retorno parcial das respostas vasoconstritoras induzidas pela ET-1 e S6b (Figura 10).

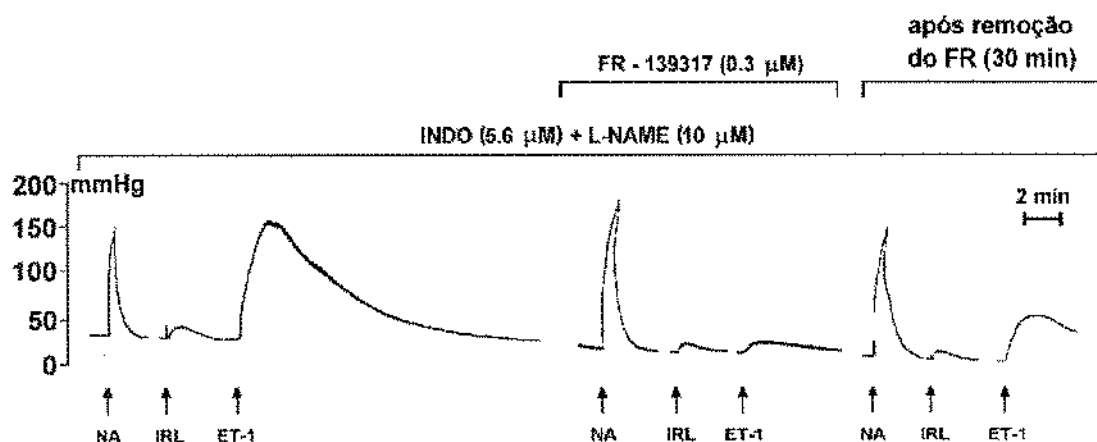


Figura 11 - Traçado experimental da pressão de perfusão arterial hepática mostrando as respostas vasoconstritoras induzidas por noradrenalina (NA; 50 nmol), IRL-1620 (1000 pmol) e endotelina-1 (ET-1; 400 pmol) na ausência e presença do antagonista FR 139317 (0,3 μ M). Convém observar que há retorno parcial da resposta vasoconstritora induzida pela ET-1 trinta minutos após o final da infusão do FR 139317. A resposta do IRL-1620 neste experimento foi totalmente diferente das obtidas nos demais experimentos.

3.5. Níveis basais de PGI₂ e TXA₂ no efluente venoso hepático

Foram coletadas amostras do efluente venoso hepático, imediatamente antes e 15 minutos após o início da infusão de indometacina. Nestas condições, os valores basais de PGI₂ durante a infusão de indometacina (6.5 ± 2.8 ng/amostra) foram significativamente menores ($P < 0.05$) do que os valores basais coletados imediatamente antes do início da infusão (20.7 ± 6.7 ng/amostra, $n=8$). De modo similar, os níveis basais de TXA₂ foram significativamente reduzidos ($P < 0.05$) durante a infusão com indometacina (15.5 ± 4.4 e 4.3 ± 1.3 ng/amostra, respectivamente, antes e após 15 min. do início da infusão de indometacina).

3.6. Liberação de prostaciclina pela ET-1, S6b e NA

As concentrações escolhidas de ET-1, S6b e NA para coleta do efluente venoso foram, respectivamente, de 120 pmol, 120 pmol e 50 nmol. Nestas concentrações, a ET-1, S6b e NA promoveram uma liberação significativa de 6-oxo-PGF_{1 α} para o efluente venoso. Conforme esperado, durante a infusão de indometacina (5,6 μ M) na circulação hepática, a liberação deste eicosanóide foi significativamente reduzida (Figura 11).

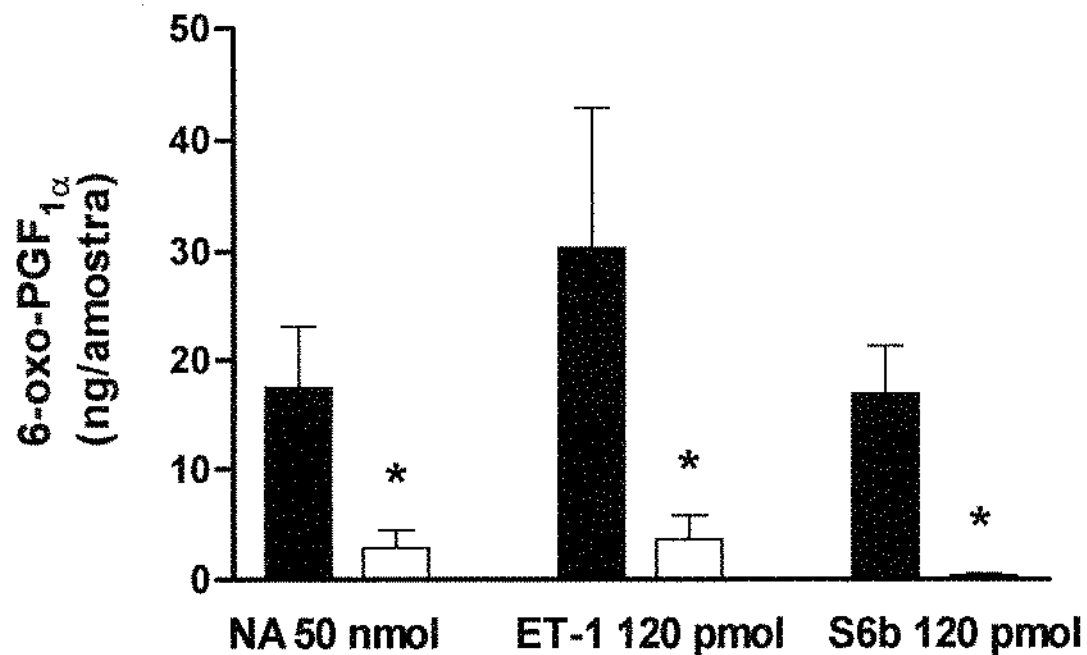


Figura 12 - O painel representa a liberação de 6-oxo-PGF₁α induzida pela administração dos agonistas NA (50 nmol), ET-1 (120 pmol) e S6b (120 pmol) antes (colunas pretas) e após (colunas brancas) a infusão de indometacina (5,6 μM). Nestes resultados já descontamos os valores basais * P<0.05, em relação aos valores obtidos na ausência de indometacina.

3.7. Liberação de tromboxano pela ET-1, S6b e NA

As injeções de ET-1 e S6b não ocasionaram aumento significativo dos níveis de TBX₂. Entretanto, a administração de NA ocasionou um aumento significativo ($P < 0.05$) na liberação deste prostanóide para o efluente hepático, sendo também, sua liberação significamente reduzida durante a infusão de indometacina (5,6 μM) na circulação hepática (Figura 12).

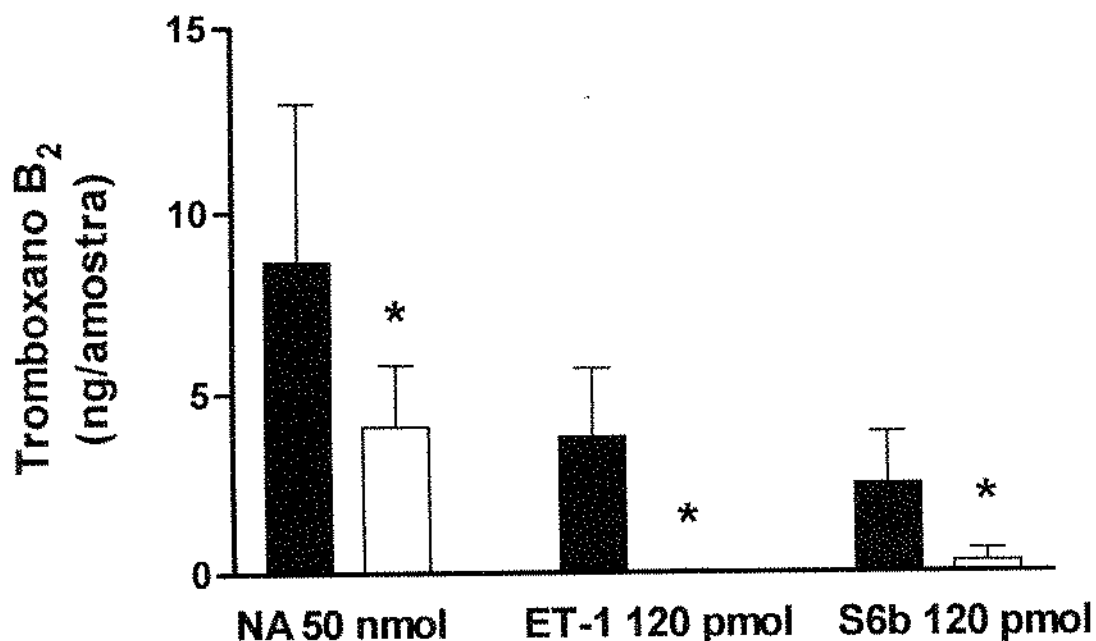


Figura 13 - O painel representa a liberação de TXA₂ induzida pela administração dos agonistas NA (50 nmol), ET-1 (120 pmol) e S6b (120 pmol) antes (colunas pretas) e após (colunas brancas) a infusão de indometacina (5,6 mM). Nestes resultados já descontamos os valores basais. * $P < 0.05$, em relação aos valores obtidos na ausência de indometacina.

3.8. Liberação de hemoglobina durante a administração de IRL-1620, ET-1 e NA.

Durante as administrações de IRL-1620, foi notado que o efluente venoso apresentava uma coloração visivelmente avermelhada, que o distinguiu do efluente basal ou do efluente oriundo das injeções de ET-1. A coloração avermelhada sugeria a presença de hemoglobina no meio. Desta forma, passamos a dosar esta substância por colorimetria.

A administração intra-arterial do IRL-1620 (1000 pmol) causou um aumento significativo ($P < 0.01$) na liberação de oxihemoglobina (Tabela 6 e Figura 13). Injeções consecutivas da IRL-1620 (1000 pmol) causaram redução sucessiva da liberação desta substância, sugerindo um efeito taquifilático. Ao contrário do IRL-1620, as injeções de ET-1 não provocaram liberação de oxihemoglobina para o efluente venoso (Tabela 6). A NA, por sua vez, causou um pequeno, porém significativo ($P < 0.05$), aumento da liberação de oxihemoglobina (Tabela 6).

Tabela 5.- Concentrações de oxihemoglobina coletadas do efluente venoso de fígado isolado de cão, antes e depois da administração de noradrenalina (NA; 50 nmol), endotelina -1 (ET-1; 120 pmol) e IRL-1620 (1000 pmol). Os valores estão expressos como média \pm SEM (n=5). * P<0.05 e ** P<0.01, em relação aos valores basais.

Agonista	Oxi-Hb(mg/dl)	
	Basal	Liberação
NA (50 nmol)	1.78 \pm 0.18	3.89 \pm 1.02*
ET-1 (120 pmol)	1.33 \pm 0.34	1.69 \pm 0.15
IRL-1620 (1000 pmol)	1.73 \pm 0.56	9.74 \pm 0.96**

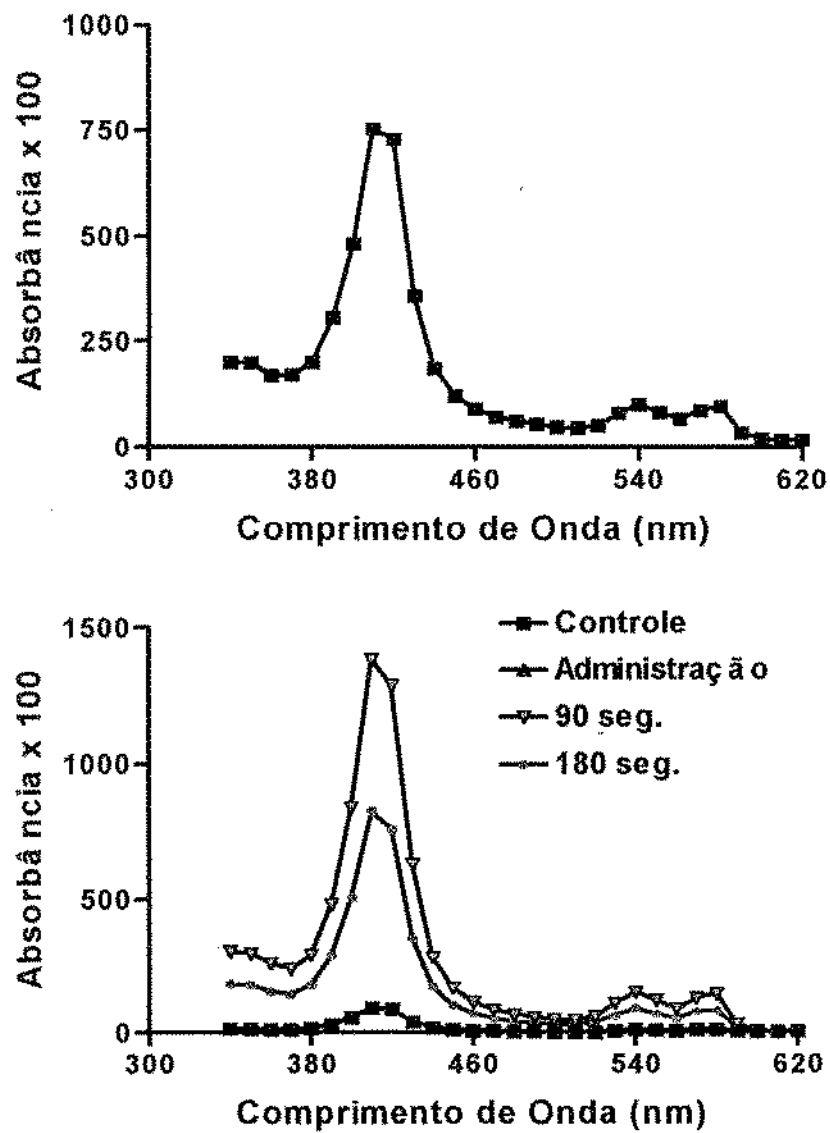


Figura 14 - O painel superior representa o perfil colorimétrico de amostra de sangue humano diluído 1/200 com hidróxido de amônia (NH_3OH). O painel inferior, representa o perfil colorimétrico de amostra provenientes do efluente venoso hepático imediatamente antes (■), no momento da administração (▲), e 90 (▼) e 180 (●) segundos após a administração de IRL-1620 (1000 pmol). Não se nota a curva no momento da administração, porque a mesma se sobrepõe a curva controle. Varredura em espectrofotômetro (340 - 620 nm).

Esses resultados foram confirmados realizando-se duas corridas eletroforéticas, a primeira comparando o efluente venoso após injeções de doses crescentes de IRL-1620 e duas diluições de sangue proveniente de cão e humano (Figura 14), e a segunda mostrando o perfil eletroforético, inclusive as bandas α e β da hemoglobina, imediatamente antes e durante a administração do IRL-1620, NA e ET-1 (Figura 15).

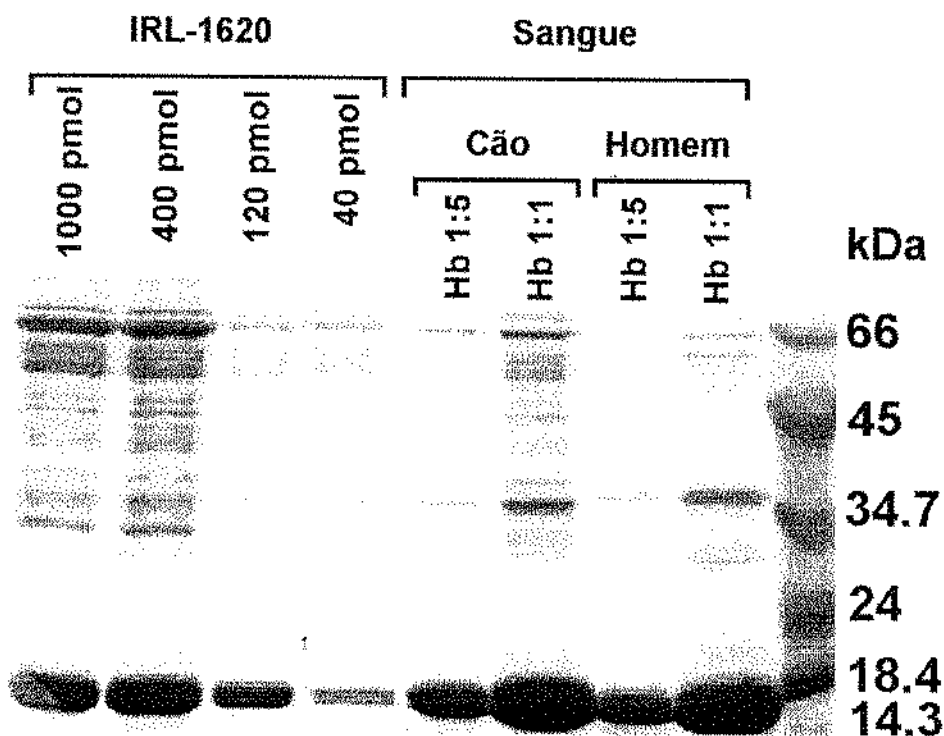


Figura 15 - Perfil eletroforético de diferentes doses do agonista IRL-1620 (40-1000 pmol) comparado a duas diferentes diluições (1:1 e 1:5) de sangue humano e canino.

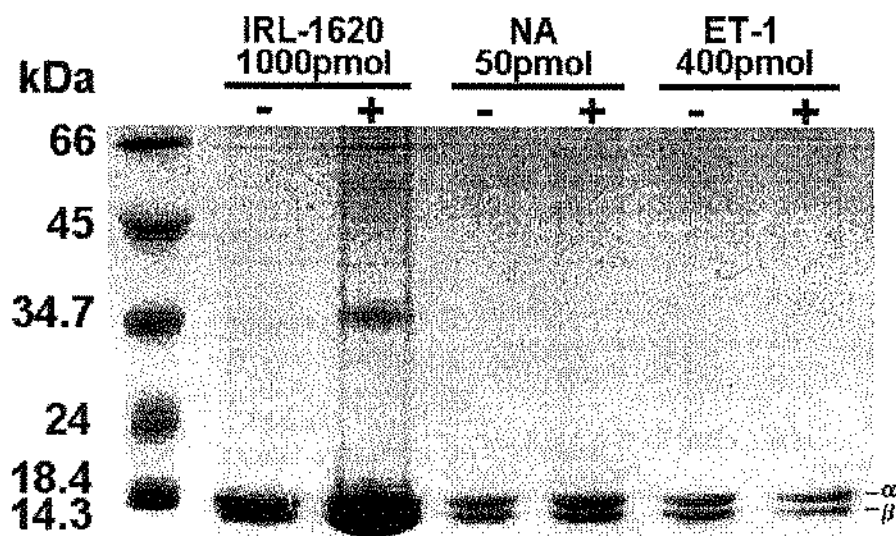


Figura 16 - Perfil eletroforético de amostra do efluente venoso hepático oriundos da administração intra-arterial de IRL-1620, NA e ET-1. Os sinais - e + indicam efluente basal e efluente oriundo dos estímulos, respectivamente. Observe que as duas bandas inferiores, representam as bandas α e β da hemoglobina.

4. Discussão

O descobrimento em 1985 e isolamento em 1988 do EDCF produzido de cultura de células endoteliais provocou um grande interesse e aumentou a atividade de pesquisa em todo mundo. A grande quantidade de publicações têm revelado importantes informações sobre genes, expressão gênica e potencial bioquímico provenientes dos peptídeos das famílias das endotelinas. E não é só, dados sobre receptores específicos de membranas, vias dos sinais de transdução e inúmeras variedades de ações biológicas são abundantes.

Esses resultados tem demonstrado que as endotelinas podem ser formadas em vários tipos de célula no corpo, bem como no endotélio, e seus efeitos podem ser observados tanto com estudos *in vitro* como *in vivo*. Aparentemente, a ação desta família de peptídeos é predominantemente local, agindo como se fossem hormônios locais atuando em locais predeterminados. Sua ação autócrina e parócrina sugere que as endotelinas possuem a capacidade de regular inúmeras funções orgânicas, tanto de maneira direta como indireta, por interação com o sistema regulador neuroendócrino.

Baseando-se em estudos de ligação antígeno-anticorpo *in vivo*, estudos de hibridização *in situ* e os conseguidos por dosagem de diferenças dos níveis plasmáticos com endotelina radioativa, várias hipóteses têm sido propostas ressaltando a significância das endotelinas, não só em processos patológicos bem como para a manutenção saudável do organismo. Entretanto, a significância tanto fisiológica como patofisiológica das endotelinas ainda não

foi completamente estabelecida. Inúmeras lacunas precisam ser preenchidas, analisadas e respondidas para o melhor entendimento da atividade destes peptídeos. Isso inclui um melhor entendimento da distribuição e regulação das funções dos subtipos de receptores para endotelina e uma melhor localização e isolamento da enzima conversora de endotelina. Por exemplo, a utilização de antagonistas para receptores específicos são importantes ferramentas para análise do papel das endotelinas no processo patológico de determinadas doenças. É possível que os receptores ET_A e ET_B atuem em diferentes doenças, ou diferentes estágios de doenças e em diferentes órgãos.

Tendo a intenção de contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de ação desta família de peptídeos, realizamos nossos experimentos utilizando fígados isolados de cães. Nossos dados mostram claramente que tanto a ET-1 quanto a S6b foram capazes de induzir respostas vasoconstritoras dependentes da dose e de longa duração no leito arterial hepático. Entretanto, o agonista seletivo para receptores do tipo ET_B, IRL-1620, não produziu efeito significativo sobre a reatividade vascular hepática.

A vasoconstrição hepática induzida por ET-1 e S6b foi acompanhada, também, por uma liberação concomitante de mediadores vasoativos (PGI₂ e NO). Na verdade, a liberação de eicosanóides decorrentes de administrações

de ET-1 já havia sido descrita em outros órgãos, tais como: baço e rins de coelho (RAE *et al.*, 1989), baço de cães (GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1994), corações perfundidos de coelhos (KARWATOWSHA PROKOPCZUCK & WENNMALM, 1990a), pulmões perfundidos de ratos (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1992) e em pulmões de cobaias (DE NUCCI *et al.*, 1988b). A grande diversidade de modelos experimentais refletem a vasta distribuição dos receptores de endotelinas nos diversos leitos vasculares.

Com esses dados e, com base nos nossos resultados, podemos afirmar que a resposta vasoconstritora à estimulação com ET-1 e S6b é a resultante de um balanço entre a vasoconstrição direta ocasionada pelo agonista e vasodilatação decorrente da liberação de mediadores vasodilatadores presentes nas células endoteliais hepáticas dentre outras.

A primeira evidência que injeções de ET-1 poderiam estimular a via metabólica do ácido araquidônico por ativação da fosfolipase A₂ foi inicialmente proposta por De Nucci *et al.*, (1988) os quais demonstraram que ET-1 causava liberação de PGI₂ e TXA₂ de preparações isoladas de pulmões de rato e cobaia, bem como a liberação de EDRF.

A participação desses mediadores é confirmada pelas respostas vasculares significativamente potenciadas após as infusões de indometacina e L-NAME e ratificada, no caso da prostaciclina, por dosagem das concentrações

deste eicosanóide no efluente venoso hepático por radioimunoensaio. Entretanto, em nossos experimentos, a liberação de TXA₂ só foi observada com a NA, que foi utilizada como controle em nossas preparações.

Como observado em outros tecidos, tanto *in vivo* (DE NUCCI *et al.*, 1988) como *in vitro* (WARNER *et al.*, 1989; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1994), a liberação concomitante de PGI₂, PGE₂ e NO, limitam o tamanho e a amplitude das respostas vasoconstritoras à ET-1.

Nossos resultados também demonstram que a resposta pressóricas induzidas pelos agonistas ET-1 e S6b são marcadamente reduzidas em presença do antagonista específico para receptores ET_A (FR 139317), como já descrita em baço (GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1994), na pressão sangüínea e na resistência periférica de cão com insuficiência cardíaca congestiva (CLAVELL *et al.*, 1994), sem no entanto, afetar a resposta pressórica induzida pela NA. No entanto, a inibição causada pelo FR 139317 não foi irreversível, uma vez que as respostas constritoras induzidas pela ET-1 e S6b, foram parcialmente restabelecida 30 minutos após a retirada do FR 139317.

Com bases neste resultados sugerimos uma distribuição preferencial dos receptores ET_A no leito arterial hepático. Estes resultados são confirmados (MORELAND *et al.*, 1994) por um estudo recente utilizando 14 preparações diferentes de tecidos vasculares. Este estudo mostrou que existe uma predominância de receptores ET_A nos leitos de alta pressão (arterial) e a presença de receptores de ET_B nos leitos de baixa pressão (venoso).

Outro resultado que consideramos também importante mostra que o agonista IRL-1620, mesmo sem produzir efeito vasoconstritor importante, é capaz de causar uma liberação significativa de hemoglobina do sistema hepático, efeito este não observado com ET-1 (agonista ET_A e ET_B) ou com a S6b. É interessante salientar que o IRL-1620 não possui atividade hemolítica e nem hemorrágica, apesar de não termos mostrado esses dados, isto nos dá indícios que ocorre não ocorre lise de hemácias. Com esses dados sugerimos uma maior participação dos receptores ET_B nas respostas vasoconstritoras no leito venoso portal hepático, uma vez que a ação do agonista para o referido receptor é reduzida no leito arterial.

Os dados disponíveis sugerem que as endotelinas estejam intimamente ligadas a diversos processos patológicos. No nosso caso, poderíamos levar em conta aqueles processos patológicos que levam à Hipertensão Portal, tais como: Doenças Hepáticas - cirroses, fibrose hepática congênita, esquistossomose, hepatite alcoólica, hipertensão portal idiopática e sarcoidose; Doenças do Sistema Vascular - insuficiência cardíaca congestiva, pericardite constrictiva, oclusão da veia porta, veia esplênica ou veias hepáticas, lesão membranosa ou trombótica da veia cava inferior. A confirmação destes indícios e a continuidade deste estudo com uma análise mais aprofundada das respostas deste agonista, o IRL-1620 e seus antagonistas, no leito venoso hepático, podem vir a esclarecer algumas dúvidas quanto a origem das

patologias e as possíveis condutas terapêuticas a serem tomadas nos diferentes casos.

5. Conclusões

- ET-1 (agonista de receptores ET_A e ET_B) e S6b (agonista preferencialmente ET_A) induzem uma resposta vasoconstritora dependente da dose no leito arterial hepático isolado e perfundido de cão.
- A infusão dos inibidores da cicloxigenase e NO-sintase (indometacina e L-NAME, respectivamente) potenciam as respostas pressóricas induzidas pela ET-1, S6b e NA.
- O IRL-1620 (agonista seletivo de receptores ET_B) não produz efeito pressórico importante na resistência arterial hepática, mesmo na presença de indometacina e L-NAME.
- Existe uma distribuição preferencial dos receptores ET_A no leito arterial hepático
- O IRL-1620 causa uma liberação significativa de hemoglobina para o efluente venoso sugerindo uma maior presença e participação de receptores ET_B no leito portal hepático.

6. Referências Bibliográficas

- ABDEL-LATIF, A.A. & ZHANG, Y. Species differences in effects of endothelin-1 on myo-inositol triphosphate accumulation, cyclic AMP formation and contraction of isolated iris sphincter of rabbit and other mammalian species. **Invest. Ophthal. Vis. Sci.**, **32**: 2432-8, 1991.
- ARAI, S.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, **348**: 730-2, 1990.
- 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**: 236-42, 1991.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, **368**: 850-3, 1994.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **87**: 682-5, 1990.
- CLAVELL, A.L.; WRIGHT, R.S.; THOMAS, M.R.; BRANDT, R.R.; OPEGNORTH, T.J.; BRUNETT, J.C. Elevated endogenous endothelin mediates systemic vasoconstriction in experimental chronic congestive heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol. (Abstracts of the 43rd Annual Scientific Session of ACC)** **172A**, 1994.

- DAVENPORT, A.P. & MAGUIRRE, J.J. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET_A receptors in humans? **TIPS**, **15**: 9-11, 1994.
- DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R.G.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. The receptor-mediated release of EDRF and PGI₂ from bovine aortic endothelial cells is coupled. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **85**: 2334-8, 1988a.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T.; VANE, J.R. The pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and EDRF. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **85**: 9797-800, 1988b.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; LIDBURY, P.S.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Intravascular big endothelin increases circulating levels of endothelin-1 and prostaglandins in the rabbit. **Biochem. Pharmacol.**, **38**: R21-2, 1990.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TELEMAQUE, S. CLAING, A; IHARA, M.; YANO, M. Human big endothelin 1 and endothelin 1 release prostacyclin via the activation of ET-1 receptor in the rat perfused lung. **Br. J. Pharmacol.**, **105**: 773-5, 1992.
- 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**: 261-64, 1990.
- EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. **J. Biol. Chem.**, **270**: 15256-68, 1995.

- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-76, 1980.
- FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, **53**: 557-73, 1983.
- GANDHI, C.R.; STENPHESON, K.; OLSON, M.S. Endothelin, a potent peptide agonist in liver. **J. Biol. Chem.**, **265**: 17432-35, 1990.
- GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T. Effects of indomethacin on the regional haemodynamic responses to low doses of endothelins and sarafatoxin. **Br. J. Pharmacol.**, **100**: 158-62, 1990a.
- GILLESPIE, M.N.; OWASOYO, J.D.; MCMURTRY, I.F.; O'BRIAN, R.F. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **236**: 339-43, 1986.
- GOETZ, K.L.; WONG, B.C.; MADWED, J.B.; ZHU, J.L.; LEADLEY JR, J.L. Cardiovascular, renal and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. **Am. J. Physiol.**, **255**: R1064-8, 1988
- GOTO, K.; KASUYA, Y.; MATSUKI, N.; TAKUWA, Y.; KURIHARA, H.; ISHIKAWA, T.; KIMURA, S.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent calcium channel in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **86**: 3915-8, 1989
- GRASSI-KASSISSE, D.M.; ANTUNES, E.; WITHRINGTON, P.G.; DE NUCCI, G. Endogenous prostanoids modulate the vasoconstrictor activity of endothelin-1 in the isolated, perfused, canine spleen. **Br. J. Pharmacol.**, **113**: 675-80, 1994.

- GRATTON, J.P.; RAE, G.A.; CLAING, A.; TELEMAQUE, 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**: 720-6, 1995.
- GRUTTER, C.A.; GRUTTER, D.Y.; LYON, J.E.; KADOWITZ, P.J.; IGNARRO, L.J. Relationship between cyclic GMP formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **219**: 181-6, 1981
- GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** **320**: 454-6, 1986
- GRYGLEWSKI, R.J.; BOTTING, R.M.; VANE, J.R. Mediators produced by endothelial cells. **Hypertension**, **12**: 530-48, 1988
- HARRISON, V.; RANDRIATSOA, A.; SCHOEFTER, P. Heterogeneity of endothelin-sarafotoxin receptors mediating contraction of pig coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**, **105**, 511-3, 1992
- HECKER, M.; MULSCH, A.; BASSENGE, E.; BUSSE, R. Vasoconstriction and increased flow: Two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. **Am. J. Physiol.**, **265**: H828-33, 1993
- HICKEY, K. A.; RUBANYI, G.M.; PAUL, R.J. AND HIGHSMITH, R.F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, **248**: C550-6, 1985.

- HOLZMAN, S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, **8**: 409-19, 1982
- HU, S.; KIM, H.S.; JENG, A.Y. Dual action of endothelin-1 on the Ca^{2+} -activated K^+ channel in smooth muscle cells of porcine coronary artery. **Eur. J. Pharmacol.**, **194**: 31-6, 1991.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRONS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **84**: 9265-9, 1987.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYACHI, 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**: 2863-7, 1989.
- 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**: 19126-33, 1993.
- KARWATOWSHA PROKOPCZUCK, E.; WENNMALM, A. Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of prostacyclin in the isolated rabbit heart. **Circ. Res.**, **66**: 46-54, 1990a.
- KASUYA, Y.; ISHIKAWA, T.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery. **Am J. Physiol.**, **257**: H1828-35, 1989.

- KIMURA, S.; KASUYA, Y.; SAWAMURA, T.; SHINMI, O.; SUGITA, Y.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K.; MASAKI, T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13(Suppl. 5)**: S5-7, 1989.
- KLOOG, Y.; BOUSSO-MITTLER, D.; BDOLAH, A.; SOKOLOVSKY, M. Three apparent receptors subtypes for the endothelin/sarafotoxin family. **FEBS Lett.**, **253**: 199-202, 1989.
- KOSEKI, C.; IMAI, M.; HIRATA, Y.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide? **Am. J. Physiol.**, **256**: R858-66, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680, 1970.
- LE MONNIER DE GOUVILLE, A.C.; MONDOT, S.; LIPPTON, H.; HYMAN, H.; CAVERO, I. Hemodynamic and pharmacological evaluation of the vasodilator and vasoconstrictor effects of endothelin-1 in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **252**: 300-11, 1990.
- LINCOLN, T.M. & CORNWELL, T.L. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation **Blood Vessels**, **28**: 129-37, 1991.
- LINCOLN, T.M. & CORNWELL, T.L. Intracellular cyclic GMP receptors proteins. **FASEB J.**, **7**: 328-38, 1993.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, **27**: 8706-11, 1988.

- MARTIN, W.; VILLANI, G.M.; DESINGARO, J.; FURCHGOTT, R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **232**: 708-16, 1985b.
- MILLER, R.C.; PELTON, J.T.; HUGGINS, J.P. Endothelins - from receptors to medicine. **TIPS**, **14**: 54-60, 1993.
- MINKES, R.K.; HIGUERA, T.R.; ROGERS, G.F.; SHELDON, E.A.; LANGSTON, M.A.; KADOWITZ, P.J. Cardiovascular responses to vasoactive intestinal contractor, a novel endothelin-like peptide. **Am J. Physiol.**, **259**: H1152-60, 1990.
- MOLENAAR, P.; O'RIELLY, G.; SHARKEY, A.; KUC, R.E.; HARDIND, D.P.; PLUMPTON, C.; GRESHAM, A.; DAVENPOT, A.P. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. **Circ. Res.**, **72**: 526-38, 1993.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, **263**: 663-5, 1976.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-42, 1991.
- MOORE, P.K.; AL-SAWAYEH, A.O.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.A.; GIBSON, A. L-N^w-nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, **99**: 408-12, 1990.

- MORELAND, S., MCMULLEN, D., ABBOA-OFFEI, B., SEYMOUR A. Evidence for a differential location of vasoconstrictor endothelin receptors in the vasculature. **Br. J. Pharmacol.**, **112**: 704-8, 1994.
- MÜLSCH, A. & BUSSE, R. N^G-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino) methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **341**: 143-7, 1990.
- MURRY, J.J.; FRIDOVICH, I.; MAKHOUL, R.G.; HAGEN, P.O. Stabilization and partial characterization of endothelium-derived relaxing factor from cultured aortic endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **141**: 689-96, 1986.
- O'BRIAN, R.F.; ROBBINS, R.J.; McMURTRY, I.F. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. **J. Cell. Physiol. Exp. Ther.**, **252**: 1318-23, 1990.
- OHMAN, K.P.; HOFFMAN, A.; KEISER, H.R. Endothelin-induced vasoconstriction and release of atrial natriuretic peptides in the rat. **Acta Physiol. Scand.**, **138**: 549-56, 1990.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**: 524-6, 1987.
- PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. **Nature**, **333**: 664-6, 1988a.
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, **153**: 1251-6, 1988b.

- PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc. Res.**, **28**: 34-9, 1994.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br J. Pharmacol.**, **92**: 181-7, 1987a.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, **2**: 1057-8, 1987b.
- RAE, G.A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Endothelin-1 releases eicosanoids from the rabbit isolated perfused kidney and spleen. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13**, Suppl.5: S89-92, 1989.
- RAPPOPORT, R.M. & MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ. Res.**, **52**: 352-7, 1983.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, **86**: 3375-8, 1989.
- RICHARDSON, P.D.I.; WITHRINGTON, P.G. The vasodilatador actions of isoprenaline, histamine, prostaglandin E₂, glucagon and secretin on the hepatic arterial vascular bed of the dog. **Br J Pharmacol.**, **7**:581-8, 1976.
- RIEDER, H.; RAMADORI, G.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H. Sinusoidal endothelial liver cells in vitro release endothelin: augmentation by transforming growth factor beta and Kupfer cell conditioned media. **Klin. Wochenschr.**, **69**: 387-91, 1991.

- SAIDA, K.; MITSUI, Y.; ISHIDA, N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. **J. Biol. Chem.**, **264**: 14613-6, 1989.
- SAKAMOTO, A.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI, T.; TAKUWA, Y.; YANAGISAWA, H.; MASAKI, T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ET_B endothelin receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **178**: 656-63, 1991.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWAT, 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**, 732-5, 1990.
- SALMON, J.A. A radioimmunoassay for 6-keto-prostaglandin F_{1α}. **Prostaglandins**, **15**, 383-97, 1978.
- SCHMIDT, H.W.; WITTFOHT, N.H.; GERLACH, J.; PRESCHER, K.E.; KLEIN, M.M.; NIROOMAND, F. Arginine is the physiological precursor of endothelium derived nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, **154**: 213-6, 1988.
- SERRADEIL LE GAL, C.; JOUINEAUX, 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, 1991b.
- SHIMADA, K.; TAKAHASSHI, M.; TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, **269**: 18275-8, 1994.

- SNEDDON, J.M. & VANE, J.R. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, **85**: 2800-4, 1988.
- SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 510-6, 1995.
- STEWART, D.J.; KUBAC, G.; COSTELLO, K.B.; CERNACEK, P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **18**: 38-43, 1991.
- SVASTI, J. and PANIJPAN, B. SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis, a simple explanation of why it works. **J. Chem. Educ.**, **54 (9)**: 560-2, 1977.
- TAKASAKI, C.; TAMIYA, N.; BDOLAH, A.; WOLLBERG, Z.; KOCHVA, E. Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. **Toxicon**, **26**: 543-8, 1988.
- TAKASAKI, C., AIMOTO, S., KITAZUMI, K., TAKAKA, K., SHIBA, T., NISHIKA, K., FURUKAWA, Y., TAKAYANAGI, R., OHNAKA, K., NAWATA, H. Structure-activity relationship of sarafotoxins: chemical synthesis of chimera peptides of sarafotoxins S6b and S6c. **Eur. J. Pharmacol.**, **198**: 165-9, 1991.
- TAYLOR, R.N.; VARMA, M.; TENG, N.N.H.; ROBERTS, J.M. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. **J. Clin. Endocr. Metab.**, **71**: 1675-7, 1990.
- TRAN THI, T.A.; KAWADA, N.; DECKER, K. Regulation of endothelin 1 action on the perfused rat liver. **FEBS Lett.**, **318**: 353-7, 1993.

- WARNER, T.D.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **159**: 325-6, 1989a.
- WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. **J Cardiovasc Pharmacol** **13, Suppl. 5**:S85-8, 1989b.
- WATSON, S. & GIRDLESTONE, D. **TiPS Receptor Nomenclature Supplement, p. 14**, 1993.
- WITHRINGTON, P.G.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Endothelin-1 causes vasoconstriction and vasodilatation in the blood perfused liver of the dog. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13(Suppl. 5)**: S209-10, 1989.
- WITHRINGTON, P.G.; ANTUNES, E.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; DE NUCCI, G. U46619, a stable thromboxane mimetic, can constrict the canine splenic arterial vasculature without significant effect on capsular smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, **105**: 306P, 1992a.
- XU, D.; EMOTO, N.; GIAIDI, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DE WIT, D.; YANAGISAWA, M. ECE-1: A membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of Big Endothelin-1. **Cells**, **78**: 473-85, 1994.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K., MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, **332**, 411-5, 1988.

YANG, M.C.; YU, P.C.; TU, M.S.; LAY, C.S.; HONG, C.Y.; CHOU, C.K.; CHEN, C.F.; KUO, J.S. Effects of endothelin and vasopressin on portal pressure of rats. *Life Sci.*, **46**: 1929-36, 1990a.

7. Abstract

The vascular effects of endothelin-1 (ET-1; ET_A and ET_B receptor agonist), sarafotoxin 6b (S6b; ET_A receptor agonist) and IRL-1620 (ET_B receptor agonist) were investigated in the isolated canine liver arterial circuit before and after infusions of indomethacin (cyclo-oxygenase inhibitor) and N^oL-nitro arginine methyl ester (L-NAME; nitric oxide synthesis inhibitor). Noradrenaline (NA) was used as a control vasoconstrictor agent. The vena cava, portal vein and hepatic artery were cannulated *in vitro* and the liver was perfused via the hepatic artery and the portal vein with oxygenated Krebs solution at 37°C. Intra-arterial bolus injections of either ET-1 (0.4 - 400 pmol) or S6b (0.4 - 400 pmol) induced dose-dependent and long-lasting vasoconstriction accompanied by significant prostacyclin release. The vasoconstrictor responses to these peptides were increased (but not significantly) during the infusion of indomethacin (5.6 μM). Subsequent infusion of L-NAME (10 μM) potentiated both ET-1 and S6b-induced vasoconstriction ($p < 0.05$) as well as NA-induced vasoconstriction. IRL-1620 had no significant effect on the hepatic arterial vascular resistance, even in the presence of indomethacin and L-NAME. Infusion of the ET_A receptor antagonist FR 139317 (0.3 μM) markedly reduced both the ET-1 and S6b-induced vasoconstrictions without affecting those evoked by NA. IRL-1620 (but not ET-1) induced a significant release of haemoglobin into the venous effluent, suggesting that ET_B receptors are located

in the venous bed of the hepatic circulation. These results indicate that the pressor responses to ET-1 and S6b in this system are modulated by the concomitant release of vasodilator mediators, including prostacyclin and nitric oxide. These effects appear to depend primarily on the activation of the ET_A receptor.