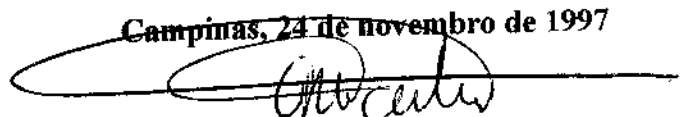


**Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia do
Biólogo Heryck José Stella.**

Campinas, 24 de novembro de 1997

A large, stylized handwritten signature in black ink, which appears to read 'Gilberto de Nucci', is written over a horizontal line.

**Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -**

HERYCK JOSÉ STELLA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS
RECEPTORES DE ENDOTELINA NA
CIRCULAÇÃO PORTAL DE FÍGADO
ISOLADO DE CÃO**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Ciências na
área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

**Campinas
1997**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
Unicamp	
St39c	
V.	Ex.
TOMOD BC/	33168
PREC	395/98
C	☐
D	☒
PREC	R\$ 11,00
DATA	26/03/98
N.º CPD	

CM-00107325-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

St39c

Stella, Heryck José

Caracterização farmacológica dos receptores de endotelina na circulação portal de fígado isolado de cão / Heryck José Stella. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Gilberto de Nucci

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

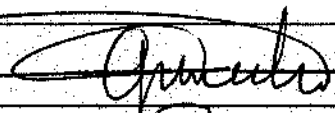
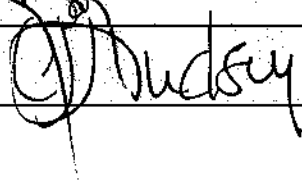
1. Hipertensão portal. 2. Óxido nítrico. 3. Endotelinas. 4. Fluxo Sanguíneo. I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci 
2. Prof. Dr. Giles Alexander Rae 
3. Prof. Dr. Charles Julian Lindsay 

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 24/11/97

Aos meus pais, que com paciência e amor forjaram no menino de ontem o caráter do homem de hoje.

À minha esposa e filha, Mercia e Bárbara, pelo apoio, incentivo e colaboração empenhados durante este trabalho.

É por estes motivos que dedico meus esforços à vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela orientação, amizade e coragem de acreditar no aluno a tanto tempo afastado dos estudos.

Aos Drs. Edson Antunes, José Geraldo P. Ferraz e Peter G. Withrington, pelo apoio, co-orientação e colaboração na viabilização deste projeto.

À Dra. Dora Maria Grassi Kassisse, que pelas mãos me ensinou a dar os primeiros passos em laboratório de pesquisa com responsabilidade e profissionalismo, sem subestimar meus tantos anos de laboratório clínico.

Ao Dr. José Pedrazoli Jr., pela oportunidade criada para meu ingresso neste curso.

Ao Dr. Domingos da Silva Leite, meu companheiro de viagens, pela amizade e dicas que ajudaram na formação de uma consciência científica.

Ao Renato do R. A. Faro, pelo treinamento das técnicas utilizadas na preparação e pelo constante apoio.

Ao Flávio do R. A. Faro, pela amizade e incansável participação em cada passo e cada madrugada de trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pela amizade e participação na formação deste aluno.

A todos os técnicos do Departamento de Farmacologia, pelas pequenas colaborações que somadas são parcela importante deste trabalho, com especial destaque para Agnaldo Fernando de Azevedo e Airton Fernando de Paula, pelo apoio técnico-cirúrgico.

Às secretárias do Departamento, Dora, Gislaine, Rita e Solange pela orientação nos assuntos burocráticos, amizade e pelo agradável convívio.

Aos colegas da pós-graduação, Aldete, Alister, Claudia Franklin, Claudia Ferreira, Cleber, Donato, Elen, Evandro, Heloisa, Jadson, Joaquim, José Eduardo, Heide, Leonardo, Lúcia, Luciana Bizeto, Luciana Nathan, Marcelo, Marcos (Rosca), Marli, Marta Pitali, Marta Madeiros, Maura, Maurício, Paula, Pamela, Renata Pereira, Renata Zanardo, Rogério, Ronilson, Simone, Sisi, Soraia, Suzana, Toninho Bento, Wellington e Wladmir, pela amizade e colaboração.

A Dra Lilian Mara Babadópulus, pelo desprendimento com que se despoja de sua liberdade em benefício dos alunos da pós-graduação.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste projeto.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

E finalmente ao cão, todos aqueles que mesmo involuntariamente se tornaram doadores, meu mais profundo respeito e gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Papel do endotélio na modulação do tônus vascular.....	3
1.1.1 Prostaciclina	4
1.1.2 Óxido nítrico	6
1.1.3 Endotelina	11
2. OBJETIVOS	20
3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	21
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

Stella, H.J. **Caracterização farmacológica dos receptores de endotelina na circulação portal de fígado isolado de cão.** Campinas: FCM, UNICAMP, 1997. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, 1997. 46 p.

Endotelinas constituem família de mediadores vasoativos, capazes de produzir respostas pressoras potentes e de longa duração em vários territórios vasculares. Por exemplo a endotelina-1 participa no controle da resistência ao fluxo sanguíneo portal, principalmente na presença de cirrose hepática e hipertensão portal. Entretanto, os receptores envolvidos nesse fenômeno não são completamente conhecidos. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a população de receptores de endotelina na circulação portal de fígado canino. Respostas vasculares portais à administração de endotelina-1 (agonista misto de receptores ET_A/ET_B), IRL 1620 (agonista seletivo ET_B) e noradrenalina foram avaliadas utilizando preparação de perfusão hepática *in vitro*. Estas respostas foram investigadas na presença/ausência de antagonistas seletivos de receptores ET_A (FR 139317) e ET_B (BQ-788). O papel do óxido nítrico e prostaglandinas nesse fenômeno foi avaliado através do uso de inibidores da óxido nítrico sintase e ciclooxigenase (L-NAME e indometacina respectivamente). Administração intraportal de endotelina-1 e IRL1620 resultou em aumento dependente da dose na resistência do fluxo portal, efeito atenuado pelo tratamento com FR 139317 e BQ-788, respectivamente. Inibição da síntese de óxido nítrico e prostaglandinas potencializou a resposta vascular portal induzida pela endotelina-1, sem afetar as respostas ao IRL 1620. Os resultados sugerem a existência de uma população mista de receptores de endotelina na circulação portal de fígado canino. O aumento na resistência ao fluxo portal induzido pela administração de endotelina-1 é mediado por receptores ET_A e ET_B , sendo o efeito mediado pelos receptores ET_A modulado por óxido nítrico e prostaglandinas. A ativação de receptores ET_B pode ter papel importante no controle da resistência ao fluxo sanguíneo portal na presença de cirrose hepática e hipertensão portal, condição associada a elevados níveis circulantes de endotelina-1 e de endotelina-3.

Palavras chave

1. Hipertensão portal. 2. Óxido nítrico. 3. Endotelinas. 4. Fluxo sanguíneo,

ABSTRACT

Stella, H.J. **Pharmacological characterization of endothelin receptors in the portal circulation of the isolated canine liver.** Campinas: FCM, UNICAMP, 1997. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, 1997. 46 p.

Endothelins constitute a family of vasoactive mediators, capable of producing potent and long-lasting pressor responses in several vascular territories. Endothelin-1 has been implicated in the regulation of resistance to portal blood flow, particularly in the presence of cirrhosis and portal hypertension. However, the receptor subtypes mediating this phenomenon have not been clearly elucidated. In this study we attempted to characterize the endothelin receptor population in the portal circulation. Portal vascular responses to endothelin-1 (ET_A/ET_B agonist), IRL 1620 (ET_B agonist) and noradrenaline were investigated using the isolated, perfused canine liver. The effects of a selective ET_A receptor antagonist, FR 139317, and the selective ET_B receptor antagonist, BQ -788, on portal vascular responses to the agonists were investigated. In addition, the modulation of these responses by prostaglandins and nitric oxide were also assessed. Endothelin-1 and IRL 1620 produced a dose-dependent increase in portal inflow resistance. This effect was significantly attenuated by treatment with FR 139317 and BQ-788. Blockade of prostaglandin and nitric oxide synthesis with indomethacin and L-NAME, respectively, potentiated the endothelin-1-, but not IRL 1620-induced portal vascular responses. We conclude that there is a mixed population of endothelin receptors in the portal circulation of the canine liver. Endothelin-1-induced portal vasoconstriction is mediated by ET_A and ET_B receptors. The effects induced via ET_A receptors is modulated by prostaglandins and nitric oxide. ET_B receptor activation might play an important role in resistance to portal blood flow in disease states such as portal hypertension, a condition associated with increased circulating levels of endothelin-1 and endothelin-3.

Key Words

1. Portal hypertension. 2. Nitric oxide. 3. Endothelins. 4. Blood flow.

1 - Introdução

O fígado apresenta duplo suprimento sangüíneo, da artéria hepática própria, (responsável por 30% do fluxo total) e da veia porta. Este órgão tem estrutura uniforme, constituída de lâminas celulares anastomosadas com sinusóides interpostos. As células hepáticas lançam suas secreções em diminutos canálculos bilíferos que se unem para formar dúctulos, os quais, por sua vez, confluem para formar os ductos intra-hepáticos. Estas células são nutridas pelos ramos da veia porta e pela artéria hepática, que acompanham o sistema canalicular e finalmente se lançam nos sinusóides. Assim, as células hepáticas são perfundidas com uma mistura de sangue venoso do canal intestinal e de sangue arterial da artéria hepática. Os sinusóides são drenados por veias (central) que desembocam na veia cava inferior por intermédio das veias hepáticas (Fig. 1).

Vários fatores interferem e regulam a pressão sangüínea intra-hepática. De certa forma, pode-se dividir estes fatores em dois tipos. Os sistêmicos, que atuam, por exemplo, nas oscilações da freqüência cardíaca, pressão arterial, pressão da artéria mesentérica, fluxo portal pós-prandial, volemia e neuronal. E os locais, que estão restritos ao órgão, tais como: fatores metabólicos, secretório (bile), hormonal (por exemplo, o glucagon), fluxo e pressão arterial e portal e fatores endoteliais.

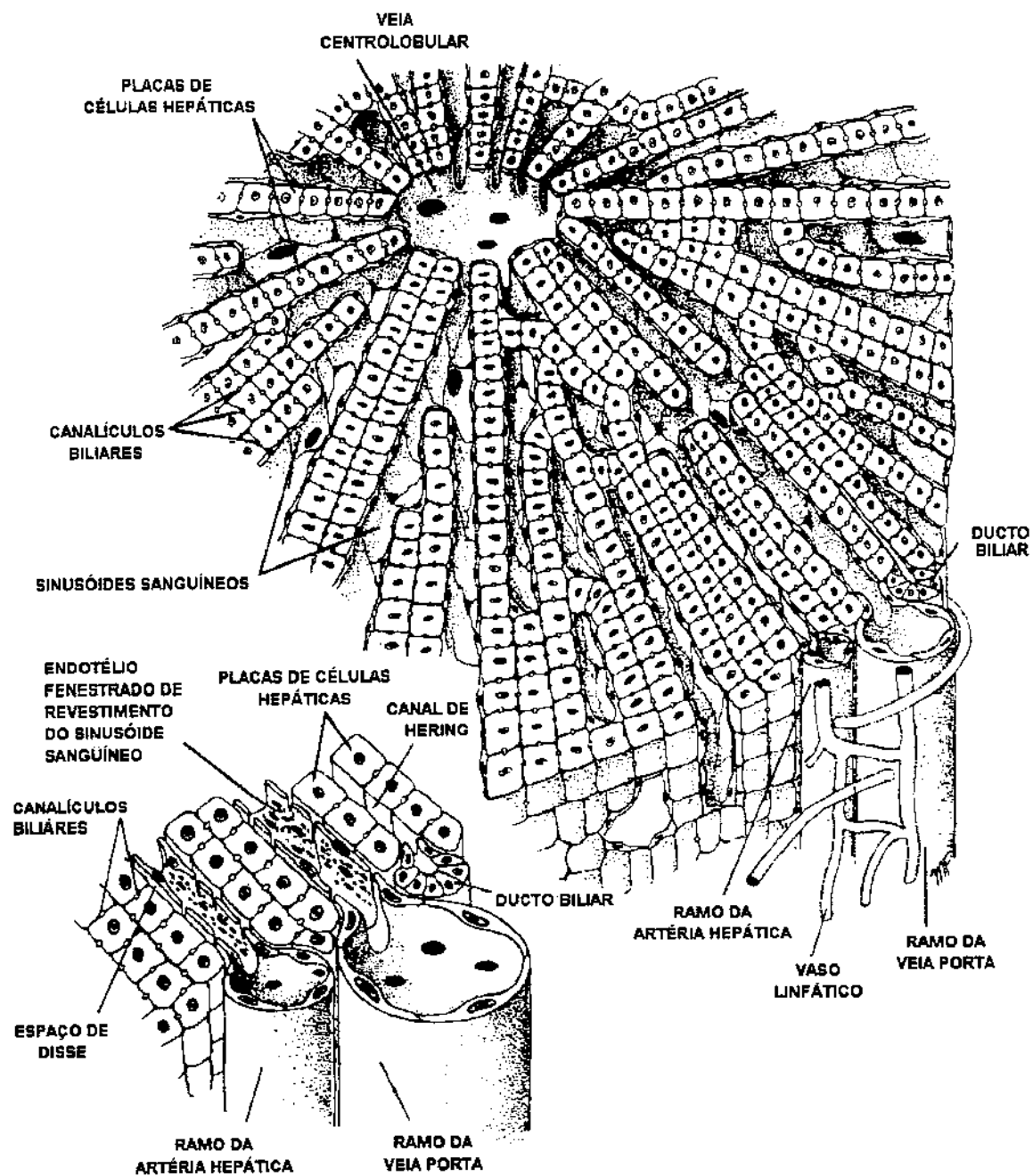


Figura 1. Parte de um lóbulo hepático: abaixo observa-se em maior aumento a tríade portal. Para maior clareza, as células de Kupfer foram omitidas.

Fonte: Snell, 1985 - Traduzido pelo autor.

Este projeto teve como parte de seus objetivos estudar fatores vasculares que afetam a pressão hepática e, por este motivo, foi necessário isolar o órgão do animal, anulando assim os fatores sistêmicos.

1.1 Papel do endotélio na modulação do tônus vascular

O endotélio é formado por uma camada única de células endoteliais que acompanham todo o sistema circulatório. Na década passada o endotélio foi reconhecido como fundamental no controle da hemostasia, particularmente na regulação do tônus vascular (FURCHGOTT, 1983; GRYGLEWSKY ET AL., 1988).

O endotélio vascular é capaz de sintetizar dois potentes vasodilatadores e inibidores da função plaquetária: a prostaciclina (PGI_2 ; MONCADA et al., 1976) e o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). O endotélio libera ainda um fator hiperpolarizante (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) capaz de causar vasorrelaxamento por induzir a hiperpolarização de membranas celulares de músculo liso vascular (FELETOU & VANHOUTTE, 1988; CHEN & SUZUKI, 1989). Embora a natureza química desse fator ainda seja desconhecida, TARE et al. (1990) demonstraram o envolvimento do óxido nítrico nesta resposta, o que foi confirmado mais tarde por BOLOTINA et al., (1994).

1.1.1 Prostaciclina

A síntese da prostaciclina ocorre a partir de ácidos graxos essenciais (provenientes da dieta) que se transformam em fosfolípidos por esterificação na membrana. Estes, por ação da fosfolipase A_2 dão origem ao ácido araquidônico, responsável pela origem de duas famílias de autacóides: uma formada pelas prostaglandinas (PGE_2 , PGD_2 e $PGF_{2\alpha}$), prostaciclina e tromboxano e outra formada pelos leucotrienos. A PGI_2 é quimicamente instável com meia vida de 2 a 3 minutos e é convertida em 6-ceto $PGF_{1\alpha}$.

A PGI_2 age em receptores específicos acoplados à adenil ciclase através de proteínas G aumentando os níveis do segundo mensageiro, o AMPc (GORMAN et al., 1977; TATESON et al., 1977; ITO et al., 1980).

O AMPc formado intracelularmente ativa uma proteína quinase AMPc-dependente sendo, a seguir, metabolizado para 5'-AMP (produto biologicamente inativo) por uma fosfodiesterase específica (fosfodiesterase do AMPc). A maioria dos mecanismos de vasodilatação envolvendo o AMPc, até agora citados, relatam a fosforilação da quinase da cadeia leve da miosina (myosin light chain kinase, MLCK). Esta fosforilação reduziria a afinidade da MLCK por um complexo cálcio-calmodulina, resultando em diminuição da fosforilação de miosina e, conseqüentemente, produção de relaxamento (MURRAY, 1990).

Dentre as ações farmacológicas da PGI_2 , as principais são:

a) Inibição da agregação plaquetária. Este fato e a observação de que a PGI_2 é sintetizada pelo endotélio vascular levaram à sugestão de que a substância controla a agregação de plaquetas *in vivo* e contribui para as

propriedades não trombogênicas da parede vascular (MONCADA & VANE, 1979);

b) A administração intravenosa de PGI_2 causa hipotensão pronunciada, sendo cerca de cinco vezes mais potente que a PGE_2 . A hipotensão é decorrente sobretudo da capacidade da PGI_2 de relaxar diversos tipos de músculo liso vascular;

c) Causa broncodilatação na maioria das espécies estudadas. Além disso, a prostaciclina antagoniza a broncoconstrição induzida por outros agentes;

d) Produz relaxamento de útero humano grávido;

e) A PGE e PGI_2 são vasodilatadoras da mucosa gástrica sendo que a PGI_2 está envolvida na regulação local do fluxo sanguíneo.

A degradação da PGI_2 aparentemente começa com sua hidrólise espontânea no sangue para 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$. O metabolismo desta substância nos seres humanos envolve os mesmos estágios do metabolismo para a PGE_2 e $\text{PGI}_{2\alpha}$ (ROSENKRANZ et al., 1980), ou seja, um estágio inicial (relativamente rápido), catalisado por enzimas prostaglandina-específicas, e um segundo estágio (relativamente lento) no qual tais metabólitos são oxidados por enzimas provavelmente idênticas àquelas responsáveis pela oxidação β e ω para a maior parte dos ácidos graxos.

1.1.2 Óxido nítrico

Antes de se ter a certeza de que o EDRF era o próprio óxido nítrico (NO), foi aventada a hipótese de que ambos eram a mesma substância com denominações diferentes. Tal hipótese apoiava-se nas seguintes evidências:

a) A atividade do EDRF é idêntica à do óxido nítrico autêntico, em tecidos vasculares (PALMER et al., 1987);

b) As ações de ambos os compostos são potenciadas pela enzima superóxido desmutase (PALMER et al., 1987) e abolidas pela hemoglobina e pelo azul de metileno (GRUTTER et al., 1981; MARTIN et al., 1985b);

c) Ambos induzem seus efeitos relaxantes na musculatura lisa vascular através da estimulação da guanilato ciclase solúvel, levando a um acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc; HOLZMANN, 1982; RAPAPORT & MURAD, 1983) e à modificação de vários processos celulares dependentes de GMPc (LINCOLN & CORNWELL, 1991 e 1993), incluindo a ativação de canais de potássio, através da proteína quinase dependente de GMPc (ROBERTSON et al., 1993; TANIGUCHI et al., 1993);

d) Ambos causam inibição da agregação e, principalmente, da adesão plaquetária (RADONSKI et al., 1987a,b; SNEDDON & VANE, 1988);

e) As duas substâncias possuem meia vida semelhantes e são estáveis em soluções ácidas (MURRY et al., 1986).

O óxido nítrico é sintetizado nas células endoteliais a partir de um nitrogênio guanido-terminal do aminoácido L-arginina (PALMER et al., 1988a,b; SCHMIDT et al., 1988), tendo a L-citrulina como co-produto da reação (PALMER

& MONCADA, 1989; Figura 2). Esta reação é específica, visto que alguns análogos de L-arginina e mesmo de D-arginina não atuam como substrato da reação.

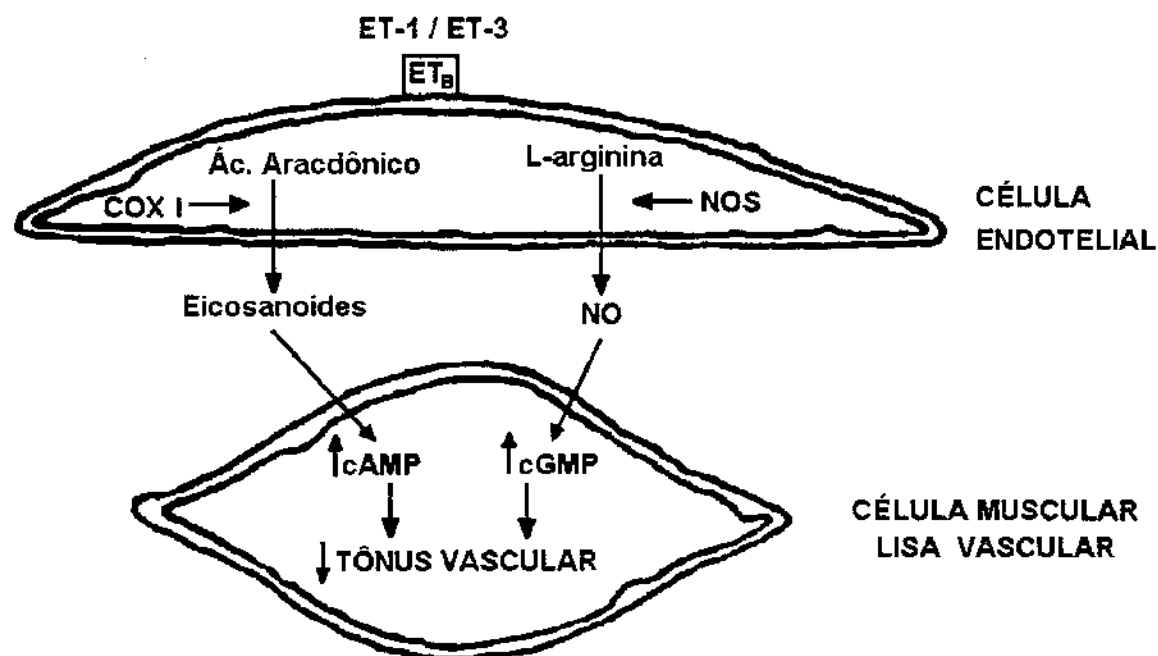


Figura 2. Biossíntese do NO e Eicosanóides e seus respectivos mecanismos de ação vasorelaxante.

Fonte: VANHOUTTE & EBER, 1991 - Adaptado pelo autor.

As enzimas responsáveis pela síntese do NO, óxido nítrico sintases (NOS) são consideradas dioxigenases, na medida que incorporam oxigênio molecular ao nitrogênio guanidino terminal da L-arginina, resultando na síntese de NO e L-citrulina. Três tipos distintos de NOS foram descritos: duas constitutivas (NOS-I e NOS-III) dependentes de cálcio e calmodulina (BREDT & SNYDER, 1990 e FORSTERMANN et al., 1993, respectivamente) e uma induzível (NOS-II), cálcio-independente (MARLETTA et al., 1988; Figura 3). Ambas as

enzimas são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). As enzimas constitutivas são ativas como monômero, enquanto que a induzível, proveniente do macrófago, é menor e atua como um dímero (STHUER et al., 1991). Elas apresentam homologia com o citocromo P-450, contêm simultaneamente flavina adenina mononucleotídeo (BREDT et al., 1991; STHUER et al., 1991) e um grupo heme, ao qual liga-se o monóxido de carbono, indicando a presença de ferro na enzima constitutiva cerebelar (MCMILLAN et al., 1992) e na induzível do macrófago de camundongos (WHITE & MARLETTA, 1992). A NOS-III está presente predominantemente nas células endoteliais (FORSTERMANN et al., 1993) enquanto que a NOS-I está presente predominantemente em neurônios (BREDT & SNYDER, 1990). A NOS-II é encontrada nos macrófagos (MARLETTA et al., 1988), hepatócitos (BILLIAR et al., 1990; GELLER et al., 1993), células endoteliais (RADOMSKI et al., 1990), músculo liso (BUSSE & MULSCH, 1990) e condrócitos humanos (PALMER et al., 1993), mediante ativação por citocinas e lipopolissacáride.

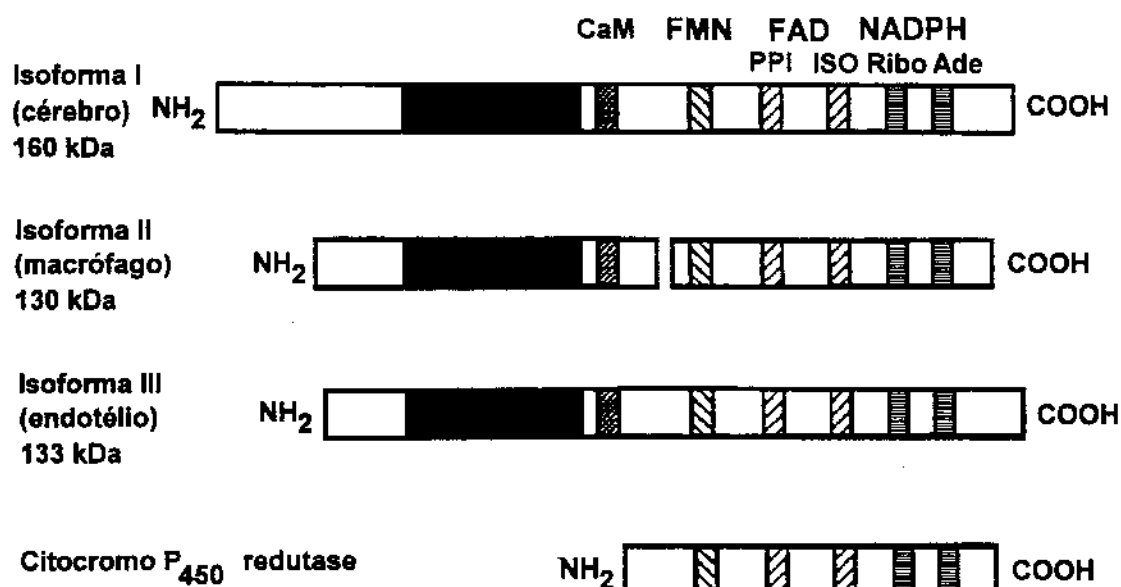


Figura 3. Diagrama esquemático mostrando a afinidade espacial entre as três isoformas de NO-sintase clonadas e o citocromo P 450 redutase.

Fonte: FORSTERMANN et al., 1993 - Traduzido pelo autor.

Alguns análogos da L-arginina, como a monometil-L-arginina (L-NMMA), inibem especificamente a síntese de NO e a formação de L-citrulina em macrófagos (MARLETTA et al., 1988). Esta inibição é revertida pela L-arginina (mas não pela D-arg), sugerindo que tais análogos inibem a formação de NO por competir com a L-arginina pelo sítio ativo da enzima responsável. Igualmente, o L-NMMA inibe a liberação de NO *in vitro* (PALMER et al., 1988a) e *in vivo* (REES et al., 1989), sendo este efeito revertido pela L-arginina. Além do L-NMMA, outros análogos da L-arginina (nitro-L-arginina e N^ω-amino-arginina) foram descritos como potentes inibidores da liberação de NO (FUKUTO et al., 1990; ISHII et al., 1990; MOORE et al., 1990). Outros inibidores foram ainda sintetizados, destacando-se a N^ω-nitro-L-arginina (L-NNA), o N^ω-nitro-arginina metil éster (L-

NAME; MOORE et al., 1990), utilizado neste projeto, e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO; MULSCH & BUSSE, 1990).

O óxido nítrico é um importante mediador em várias ações biológicas (MONCADA, 1992). No sistema imunológico, NO está envolvido com mecanismos imunorregulatórios, microbicidas e de citotoxicidade (LIPTON et al., 1993; SNYDER, 1993). No sistema nervoso central e periférico, o NO age como um neurotransmissor (SNYDER & BREDT, 1991), enquanto no sistema cardiovascular, é um potente vasorrelaxante e inibidor da agregação plaquetária, sendo por isso, considerado um nitrovasorrelaxador endógeno e antitrombótico (PALMER et al., 1987).

A liberação de NO pode ser estimulada por vários agentes que atuam por mecanismos dependentes e não dependentes de receptores, tais como: ADP/ATP (MARTIN et al., 1985a), bradicinina (CHERRY et al., 1982), substância P, (ZAWADSKI et al., 1981), histamina e angiotensina II (TODA, 1984), serotonina (COCKS & ANGUS, 1983), polications (IGNARRO et al., 1989), ácido araquidônico (DE NUCCI et al., 1988a), pH extracelular elevado (MITCHELL et al., 1991), timerosal, tripsina e fatores físicos como força de cisalhamento (*shear stress*; GRYGLEWSKI et al., 1988). A liberação do NO em vários leitos vasculares é o principal fator na regulação da pressão sangüínea (REES et al., 1989) e do fluxo sangüíneo regional (GARDINER et al., 1990b).

O NO é, portanto, um vasodilatador importante para a manutenção da homeostase cardiovascular. No fígado, participa dessa homeostase, uma vez

que é liberado sempre que receptores de agonistas vasoconstritores são ativados no leito arterial *in vitro* (FARO et al., 1995).

1.1.3 Endotelina

A endotelina-1 (ET-1) foi inicialmente isolada a partir de sobrenadantes de cultura de células endoteliais de aorta porcina (YANAGISAWA et al., 1988). Esta substância consiste de um peptídeo com vinte e um aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto que ligam os resíduos de cisteína (Cys¹ - Cys¹⁵ e Cys³ - Cys¹¹). A estrutura molecular deste peptídeo é incomum em mamíferos, mas freqüentemente encontrada em certos grupos de toxinas que agem em canais de membranas, tais como: a apamina, a conotoxina e as neurotoxinas do veneno de certos escorpiões (YANAGISAWA et al., 1988). Posteriormente, demonstrou-se que as seqüências de aminoácidos das endotelinas são muito semelhantes àsquelas das toxinas do veneno da serpente rara *Atractaspis engaddensis* (TAKASAKI et al., 1988; TAKASAKI et al., 1991)

Atualmente existem três isoformas de endotelinas descritas na literatura (Figura 4). Uma delas corresponde exatamente àquela descrita primeiramente em sobrenadante de cultura de células endoteliais e, por isso, foi denominada de ET-1. As outras duas foram denominadas de ET-2 e ET-3 (encontradas em ratos e homogenato de medula espinhal e cérebro porcinos; INOUE et al. 1989).

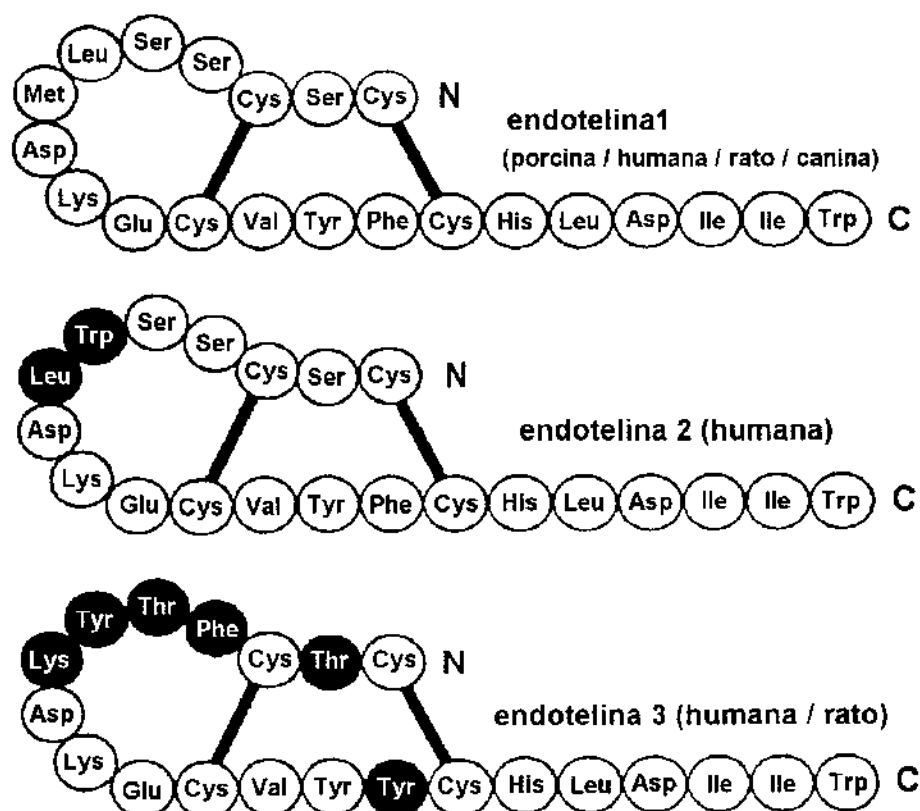


Figura 4. Sequência de aminoácidos das ET-1, ET-2 e ET-3 mostrando as ligações dissulfeto e os resíduos que diferem entre si (círculos cheios).

Fonte: HUGGINS et al., 1993 - Traduzido pelo autor.

Em humanos, a ET-1 é formada inicialmente a partir de um precursor que contém duzentos e três aminoácidos. Este precursor é denominado de pré-pró-endotelina-1 (ppET-1) e é clivado por uma peptidase (específica para aminoácidos básicos pareados) imediatamente após os resíduos de Lys⁵¹ - Arg⁵² da ppET-1 e os resíduos Arg⁹² - Arg⁹³ da ppET-1 porcina, e Arg⁹¹ - Arg⁹² da ppET-1 humana. A clivagem da ppET-1 dá origem à pró-endotelina, um produto intermediário com trinta e nove resíduos de aminoácidos em porcos e trinta e

oito em humanos (YANAGISAWA et al., 1988). A ET-1 se origina a partir de uma clivagem proteolítica não usual entre os resíduos Trp²¹ - Val²² da pró-endotelina, pela enzima conversora de endotelina (ECE; Figura 5). A pró ET-1 é equipotente à ET-1 em causar aumento na pressão arterial *in vivo*. No entanto, tem somente 1% da potência da ET-1 no que se refere ao efeito contrátil em segmentos vasculares *in vitro* (KIMURA et al., 1989). Isto indica que a pró ET-1 é rapidamente convertida a ET-1 *in vivo*, pela ECE (D'ORLEANS-JUSTE et al., 1990). Duas formas de ECEs foram clonadas: ECE-1, responsável pela conversão de pró ET-1 em ET-1 ao nível da membrana celular (XU et al., 1994), e ECE-2 responsável por esta conversão no meio intracelular (EMOTO et al., 1995). Tais descobertas elucidaram a diferença de potência da pró ET-1 e ET-1 tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A ET-1 é o mais potente agente vasoconstritor até hoje descrito. A administração endovenosa de ET-1 em ratos anestesiados e quimicamente desnervados induz uma breve resposta depressora seguida por uma resposta pressora de longa duração (YANAGISAWA et al., 1988; DE NUCCI et al., 1988b; GARDINER et al., 1990a; OHMAN et al., 1990; LE MONIER DE GOUVILLE et al., 1990). Tal efeito é extensivo a outras espécies animais como gatos (MINKES et al., 1990) e cães (GOETZ et al., 1988).

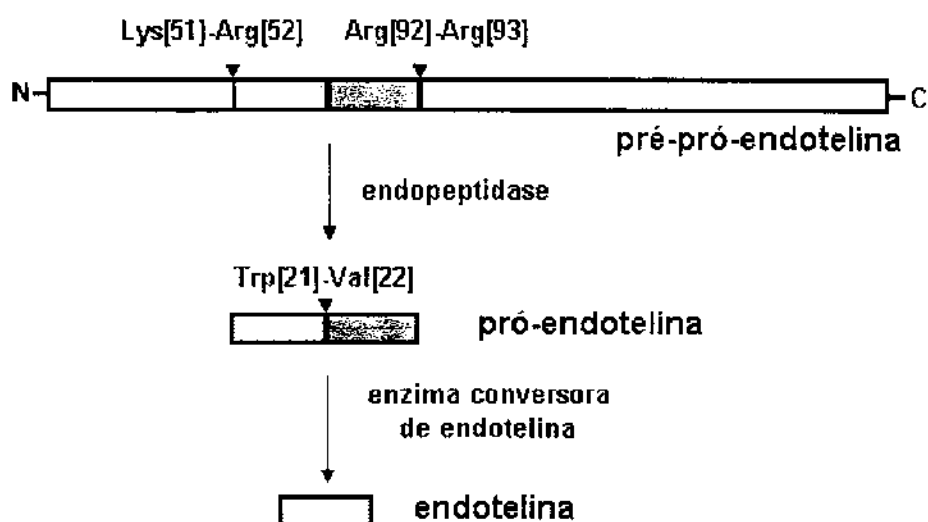


Figura 5. Biossíntese da ET-1. A seqüência da endotelina está ilustrada na porção cinza claro. A endopeptidase específica para o par de aminoácidos dibásicos a “big endotelina”, um precursor da endotelina que provém da ppET. A enzima conversora de endotelina cliva a ligação entre Trp²¹ - Val²² liberando a ET-1.

Fonte: YANAGISAWA et al., 1988. - Traduzido pelo autor.

A vasoconstrição induzida pela endotelina é mediada através de dois sistemas distintos de transdução mediados através de proteínas G (Figura 6): ativação de canais de cálcio (YANAGISAWA et al., 1988; GOTO et al., 1989; KASSUYA et al., 1989) e ativação da fosfolipase C (ABDEL-LATIF & ZHANG, 1991; HU et al., 1991; RESINK et al., 1988; STOJILKOVIC et al., 1991; TAKUWA et al., 1990). O efeito vasodilatador, por sua vez, é mediado pela ativação da fosfolipase A₂, promovendo liberação de prostanóides, principalmente a PGI₂ e a prostaglandina E₂ (DE NUCCI et al., 1988b; FILEP et al., 1992; GRANSTAM et al., 1991; RESINK et al., 1989; WARNER et al. 1989b;).

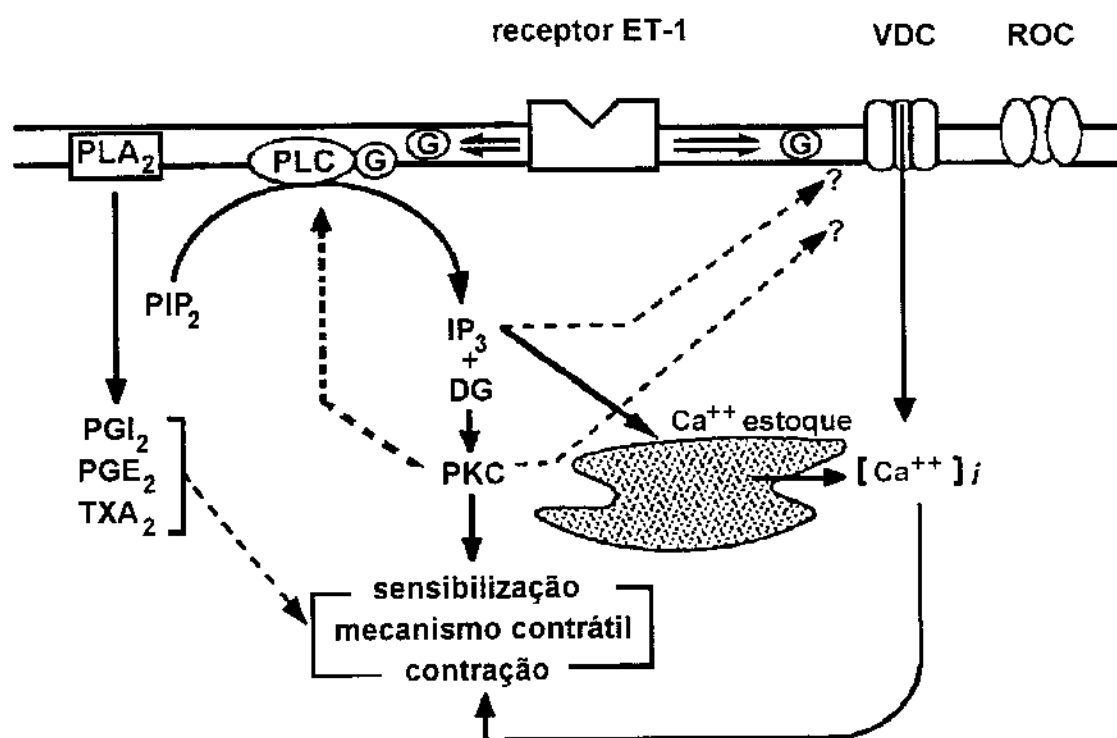


Figura 6. Vias de transdução de sinais intracelulares ativados pelas endotelinas (ETs). O receptor de ET ativado estimula a fosfolipase C (PLC) e a fosfolipase A₂ (PLA₂). O receptor de ET ativado também estimula canais de cálcio dependentes de voltagem (VDC) e, provavelmente, canais de cálcio operados por receptor (ROC). O trifosfato de inositol (IP₃) estimula a liberação de cálcio de estoques de cálcio sensíveis a cafeína. A ativação da proteína quinase C (PKC) pelo diacilglicerol (DG) sensibiliza o mecanismo contrátil. Os níveis elevados de cálcio intracelular induzem a contração. Os produtos da ciclo-oxigenase PGI₂, PGE₂ e TXA₂ modulam a contração.

Fonte: MASAKI et al., 1991 - Traduzido pelo autor.

A vasodilatação induzida pelas endotelinas é ainda decorrente da liberação de EDRF/NO pelas células endoteliais (DE NUCCI et al., 1988b; WARNER et al., 1989b). Por esse motivo, acredita-se que os efeitos

vasoconstritores induzidos pela ET-1 tanto *in vivo* (DE NUCCI et al., 1988b) quanto em certos leitos vasculares *in vitro*, tais como: mesentérios de ratos (WARNER et al., 1989a), fígado de cães (WITHRINGTON et al., 1989), baço e rins de coelhos (RAE et al., 1989), são modulados pela liberação de EDRF/NO, e/ou PGI₂ e PGE₂, os quais limitam a amplitude e a 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, quanto nas células endoteliais (DAVENPORT & MAGUIRRE, 1994). Estudos autorradiográficos em tecidos de ratos demonstraram que sítios ligantes para a endotelina estão presentes nos rins (glomérulo e papila), pulmões (nos alvéolos, nos brônquios, e na traquéia estes sítios foram localizados não somente na camada muscular, mas também na camada de células epiteliais), gânglios adrenais (medula), neurônios e na camada mucosa do cólon, do intestino e do estômago (KOSEKI et al., 1989). Em mesentério isolado e perfundido de ratos, a ET-3 age principalmente como um vasodilatador, sendo mais ativa que a ET-1. Neste mesmo leito vascular, a ET-3 foi menos ativa que a ET-1 como agente vasoconstritor. Esta diferença no perfil de ação entre ET-1 e ET-3 fez com que WARNER et al. (1989a) sugerissem a existência de receptores diferentes em células endoteliais e células musculares lisas. A partir daí, surgiram numerosos estudos com o objetivo de detectar os receptores de endotelina usando-se, para tanto, membranas de diferentes tecidos tais como coração de aves (WATANABE et al., 1989) pulmão de rato (MASUDA et al., 1989), células mesangiais de ratos (SUGIURA et al., 1989), placenta humana (NAKAJO et al., 1989), cerebelo

bovino (SCHVARTZ et al., 1990) e outros. Nesses estudos, demonstrou-se também a existência de dois ou três tipos de receptores.

Hoje está plenamente estabelecida a existência de dois tipos de receptores endotelinérgicos, denominados ET_A e ET_B . Entretanto, um terceiro tipo, o ET_C , foi descrito por KLOOG et al., 1989; por EMORI et al., 1990; e por HARRISON et al., 1992, sendo que pouco se sabe a seu respeito, pois, nenhum agonista ou antagonista específico para este receptor foi descrito até o momento. A classificação dos receptores endotelinérgicos ET_A e ET_B está baseada nas afinidades relativas para com as três isoformas de endotelina. A ET-1 e a ET-2 têm afinidades elevadas e semelhantes para com receptor ET_A ao passo que a ET-3 apresenta afinidade muito baixa para este receptor. Entretanto, todos os três isopeptídeos são equipotentes para o receptor ET_B (ARAI ET AL., 1990; SAKURAI et al., 1990; SAKAMOTO et al., 1991; SAKURAI et al., 1992; MOLENAR et al., 1993; WATSON & GIRDLESTONE, 1993).

Dessa forma, a vasodilatação inicial de curta duração em resposta à ET-1, observada nas várias espécies animais estudadas, foi explicada como sendo decorrente da ligação do peptídeo aos receptores ET_B em células endoteliais, promovendo assim a liberação de fatores relaxantes (EDRF/NO e PGI_2). Concentrações mais altas de ET-1 causariam constrição sustentada através da ativação dos receptores ET_A da musculatura lisa vascular. Atualmente, através do uso de agonistas e antagonistas seletivos para os diferentes tipos de receptores de endotelina (MILLER et al., 1993; WATSON & GIRDLESTONE, 1993) tem-se observado que nem sempre é verdadeira esta proposição segundo

a qual a ativação de receptores ET_A resulta em vasoconstrição enquanto que a ativação de receptores ET_B resulta em vasodilatação. Assim, a ET-1 ativa tanto receptores ET_A , quanto ET_B localizados na membrana das células de músculo liso vascular causando resposta vasoconstritora potente e de longa duração. A ET-3 ativa receptores ET_B causando resposta semelhante. A ET-1 e ET-3 são também capazes de ativar receptores ET_B localizados na membrana das células endoteliais, promovendo a liberação acoplada de NO e PGI_2 e, conseqüentemente, relaxamento vascular (figura 7).

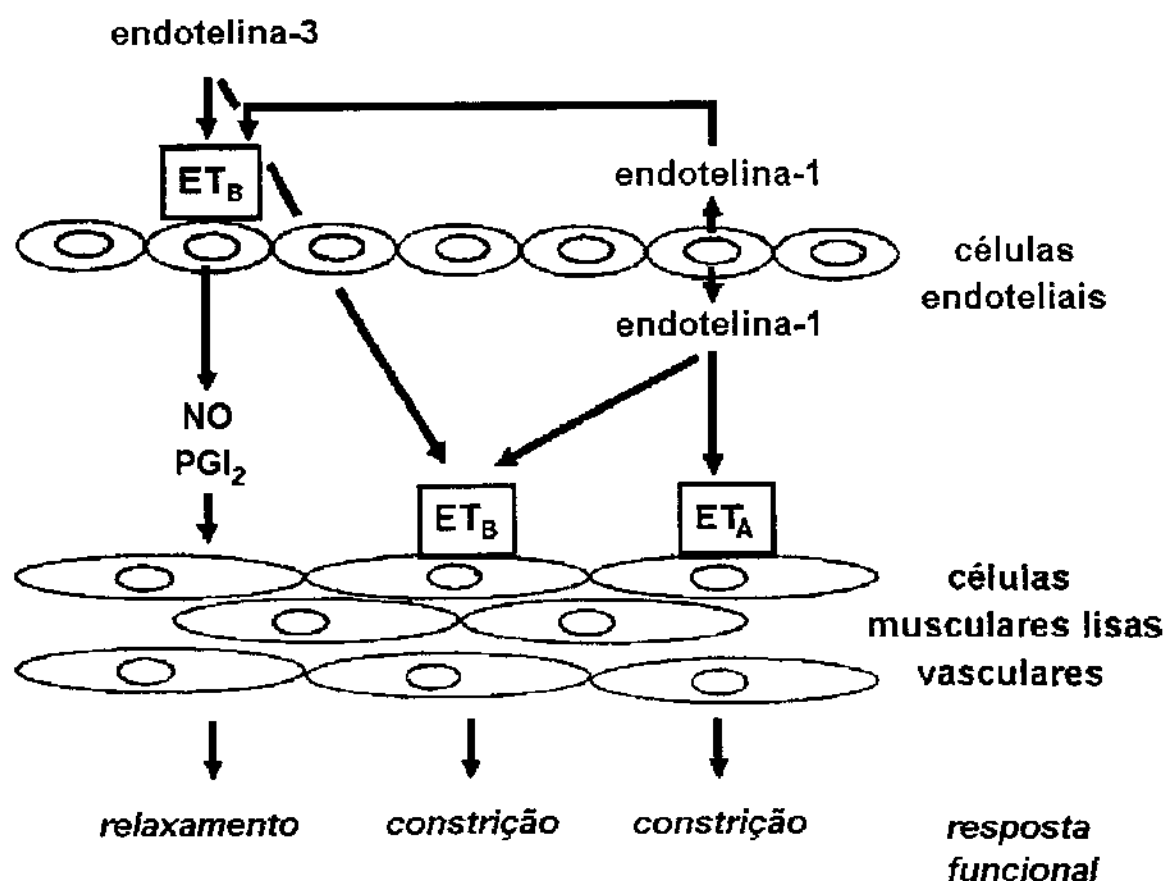


Figura 7. Mecanismo de ação da endotelina.

Fonte: DAVENPORT & MAGUIRE, 1994. Traduzido pelo autor.

Na microcirculação hepática os estudos com endotelina são escassos e pouco se sabe sobre o papel dos receptores neste sistema. Sabe-se que as células endoteliais sinusoidais hepáticas são capazes de produzir endotelina-1 quando estimuladas com $TGF\beta$ (RIEDER et al., 1991). Em fígado de rato perfundido *in situ*, injeções endovenosas de ET-1 causam vasoconstrição portal e aumento da glicogenólise (GANDHI et al., 1990; SERRADEIL LE GAL et al., 1991; TRAN THI et al., 1993; YANG et al., 1990). Entretanto, a glicogenólise 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 neste leito vascular em particular. Recentemente, foi demonstrado que, em fígado isolado e perfundido de cão, existe predomínio de receptores ET_A no leito arterial e que há liberação concomitante dos mediadores NO, confirmado pela significativa potencialização das respostas vasoconstritoras causadas pela endotelina-1 e sarafotoxina 6b (S6b; agonista ET_A) em presença de L-NAME, e prostaciclina, em presença de indometacina, assim como, pelas dosagens de 6-oxo $PGF_{1\alpha}$, produto de degradação da prostaciclina, em amostras de efluente hepático (FARO et al., 1995). Analisando diversos tecidos vasculares, MORELAND em 1994, constatou o predomínio de receptores ET_A em leitos de alta pressão e ET_B nos de baixa pressão. Baseado nestes dados e em suas próprias experiências, FARO (1995) especulou a possibilidade de haver predomínio de receptores ET_B no leito portal de cão. Ainda, em estudos realizados em fígado de rato cirrótico perfundido, foi observado predomínio de receptores ET_B no leito portal (ROCKEY & WEISIGER, 1996).

2 - Objetivos

2.1 Caracterizar receptores de endotelina existentes no leito portal hepático de fígado isolado de cão, fazendo uso do agonista não seletivo de receptores ET_A e ET_B (ET-1), agonista seletivo de receptores ET_B (IRL 1620) e dos antagonistas seletivos para receptores ET_A (FR 139317) e para receptores ET_B (BQ 788).

2.2 Estudar o papel do NO e da prostaciclina na modulação das ações de agonistas endotelinérgicos sobre o tônus vascular no leito portal, fazendo uso do L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil ester; inibidor da oxido nítrico sintase), e da indometacina (inibidor da ciclooxigenase).

3 - ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Re: MS no. E10664 Received: 22/09/97

Dr. G. De Nucci
Dept. of Pharmacol.
Fac. of Med. Sciences
UNICAMP
P.O. Box 6911
13081-970 CAPINAS, SAO PAULO
Brazil

Title:

Endothelin (ET_A and ET_B) receptor-mediated portal vascular responses
are modulated by concomitant release of nitric oxide and prostaglandins in the
isolated canine liver

Authors:

Ferrez, J.G.P., H.J. Stella, F. Faro, R. Faro, E. Antunes, P.G. Withrington,
T.J. Opgenorth, G. De Nucci

Dear Colleague,

We acknowledge the receipt of your manuscript with the above title;
it is now under review.

The decision of the editors will be sent to you as soon as possible.

Please note that, in order to reduce the mailing costs, the manuscript will
not be returned to you. Reviewers are asked to destroy their copy after the
final decision has been reached.

Yours sincerely,

The editors

N.B. Please mention the manuscript number in all your correspondence!

**ENDOTHELIN (ET_A AND ET_B) RECEPTOR-MEDIATED PORTAL VASCULAR
RESPONSES ARE MODULATED BY CONCOMITANT RELEASE OF NITRIC OXIDE
AND PROSTAGLANDINS IN THE ISOLATED CANINE LIVER**

*José Geraldo P. Ferraz¹, Heryck J. Stella¹, Flavio Faro¹, Renato Faro¹,
Edson Antunes¹, Peter G. Withrington², Terry. J. Opgenorth³,
and Gilberto de Nucci¹*

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP,
P.O. Box 6111, 13081-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil,

²Queen Mary & Westfield College, Mile End Rd., London, U.K., and

³Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A.

Running Title: endothelin-1 and portal circulation

Key words: endothelin-1, nitric oxide, portal blood flow, portal hypertension,
endothelin antagonists

Acknowledgements: H.J.S., F.F. and R.F. were supported by a studentship from
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP), Brazil. J.G.P.F. was supported by a fellowship from
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq), Brazil. P.G.W. thanks CNPq and The Royal Society of
London for travel grants. This work was supported by a grant to
G. de N. from FAPESP.

Corresponding Author: Dr. Gilberto de Nucci

Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP
P.O. Box 6911
Campinas, São Paulo, Brazil
FAX: 55 19 252 1516
E-mail: denucci@dglnet.com.br

Abstract

Endothelins constitute a family of endothelial derived vasoactive mediators with potent effects in many vascular territories through activation of ET_A and ET_B receptors. In this study, we characterized the ET receptor population in the hepatic portal circulation using selective agonists and antagonists. In the isolated perfused canine liver, intraportal injection of both ET-1 (mixed ET_A/ET_B agonist) and IRL 1620 (selective ET_B agonist) elevated portal vascular resistance; they were equipotent in their effects, although the portal vascular responses to ET-1 was very prolonged compared to IRL 1620. Both ET-1 and IRL 1620 caused significant elevations in portal vascular resistance when injected into the hepatic artery. Intraportal ET-1 and IRL 1620 produced dose-dependent increases in portal vascular resistance which was significantly antagonized by treatment with selective antagonists FR 139317 (ET_A) and BQ-788 (ET_B), respectively. We conclude that, unlike our previous study in the canine hepatic artery, the canine hepatic portal bed has a mixed population of both ET_A and ET_B receptors which, when activated, both elicit portal vasoconstriction. In addition, only the portal ET_A response was potentiated by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition with L-NAME and indomethacin, respectively. These different observations in the hepatic portal vascular bed compared with the hepatic arterial inflow may reflect a different population of cell types accessible from the hepatic portal inflow compared to the arterial inflow.

1. Introduction

Endothelin-1 (ET -1) is an endogenous 21 amino acid peptide with potent vascular effects (Yanagisawa et. al, 1988) achieved through activation of two receptor subtypes, ET_A and ET_B (Inoue et. al, 1989; Arai et. al, 1990). Intravenous administration of ET-1 produces marked, long-lasting, vasoconstrictor responses in most vascular territories, effects mediated by activation of both ET_A and ET_B receptors (Inoue et al., 1989; Okumura et al., 1994). In addition, a brief initial vasodilator phase may be observed preceding the vasoconstriction (Withrington et al., 1989); a response due to ET_B receptor stimulation (Warner et al., 1993). Therefore, the vascular responses to ET-1 are determined by the relative distribution of ET receptor subtypes present at any particular vascular site. Clearly, it is important to characterize ET receptors in any vascular territory to elucidate the predominant local mechanisms controlling inflow and to assess any potential therapeutic intervention.

Previously, we (Withrington et al., 1989) have demonstrated the potent ET-1-induced vascular responses of the two canine hepatic inflow circuits, portal and arterial, and subsequently (Faro et al., 1995), using selective ET_A antagonists and ET_B agonists, have demonstrated the predominant ET_A receptor population in the hepatic arterial vasculature.

The haemodynamic characteristics of the hepatic portal circuit are determined partly by the mesenteric circulation, but also by the hepatic portal inflow resistance. The objective of the present study was to evaluate the ET

receptor population of the canine hepatic portal vascular bed using selective pharmacological probes, such as ET_A and ET_B receptor agonists and antagonists. The results reveal a different ET receptor spectrum in the hepatic portal vascular bed to that previously described in the hepatic arterial vasculature in the dog (Faro et. al, 1995), and raises the possibility of differential pharmacological control of the two liver inflow circuits. The present results confirm and extend observations on the perfused portal bed of the isolated rat liver (Zhang et al., 1997) since, in the present experiments in the canine liver, the arterial inflow was intact, and agonists could be delivered into the hepatic arterial system, with concomitant observation of changes in the hepatic portal vascular bed; an appropriate physiological and clinical analysis.

In addition, by using inhibitors of nitric oxide synthase and cyclooxygenase, we have evaluated the contribution of nitric oxide and prostaglandin release to the portal vascular responses following activation of portal ET receptors to indicate the contribution of these vasoactive mediators to the control of hepatic portal inflow resistance by ET.

2. Material and Methods

2.1 Liver perfusion

Experiments were performed on Mongrel dogs (approximately 8.5 kg, both sexes) using guidelines determined by the State University of Campinas Animal Care Committee. Under sodium pentobarbital anesthesia (30 mg/kg i.v.), a midline laparotomy was performed and the hepatic artery and portal vein were isolated and the liver cleared of connecting tissues. Artificial respiration was supplied and a midline thoracotomy performed. Intravenous heparin (5,000 IU/dog) was administered in order to prevent blood clotting. The inferior vena cava was isolated just above the diaphragm and the vessels were ligated, sectioned and the liver removed. The hepatic artery, portal vein and vena cava were then cannulated and the liver perfused with warmed (37 °C) oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution, as previously described. Briefly, the arterial inflow was adjusted by means of a peristaltic pump to provide a perfusion pressure of 20-40 mmHg. The portal venous inflow was also supplied by a peristaltic pump, adjusted to provide a portal pressure of 2-4 mmHg. Once set, these flows were maintained constant throughout the remainder of the experiment. The preparation was allowed to equilibrate for approximately 30 minutes before starting the experiments. Hepatic arterial (HAPP) and portal (HPPP) perfusion pressures were measured with strain gauge transducers (PRC 21/3, Ugo Basile) connected to the arterial and portal perfusion circuits, respectively, and were recorded continuously throughout the experiments using a multi-channel recorder (Ugo Basile). Hepatic portal inflow vascular resistance

(HPVR) was calculated as HPPP (mmHg) divided by portal vein inflow (ml/min). Changes in portal inflow resistance following administration of test agonists are evaluated as absolute changes in resistance from the control to the maximum response to the agonists.

2.2 Experimental protocols

2.2.1 Agonists. Noradrenaline (NA) was used as an endothelin receptor-independent vasoconstrictor, whilst both endothelin-1, *endothelin-3* (ET-1, ET-3, ET_A/ET_B agonists) and IRL 1620 (selective ET_B agonist) were used to determine the endothelin receptor population in the portal vascular bed, and the consequences of their activation. NA (5-50 nmol), ET-1 (40-400 pmol) and IRL 1620 (100-1000 pmol) were administered as single bolus injections directly into the portal vein line. Consequent changes in the hepatic arterial and portal perfusion pressure were recorded continuously and changes in portal inflow resistance calculated. At least five experiments were performed for each agonist, and dose-response curves were constructed. To assess changes in portal vascular resistance to elevated systemic arterial levels of ET agonists, ET-1, ET-3, IRL 1620 and NA were administered into the hepatic artery alone and changes in both hepatic arterial vascular resistance and portal vascular resistance evaluated.

2.2.2 Endothelin antagonists. Control portal vascular responses to the agonists NA, ET-1 and IRL 1620 were assessed before infusion of either of the selective endothelin receptor antagonists, FR 139317 and BQ-788 (Opgenorth, 1995). The vascular responses to these agonists were reevaluated 15 min after

the beginning of an intra-portal infusion of either of the ET_A or ET_B receptor antagonists. Subsequently, the alternative receptor antagonist was added to the portal perfusion circuit to produce concomitant ET_A and ET_B receptor antagonism, and the vascular responses to the agonists tested 15 min after the beginning of the infusion. At least four experiments were performed for each agonist tested. In a separate set of experiments, the sequence of antagonist administration was reversed.

2.2.3. Prostaglandin and nitric oxide synthesis inhibitors. The role of prostaglandins and nitric oxide in the vascular responses produced by administration of the three agonists, NA, ET-1 and IRL 1620, was investigated by continuously perfusing the canine liver (both hepatic artery and portal vein perfusion lines) with indomethacin and/or *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Indomethacin (5.6 μ M) was added initially, and the dose-response curves to the agonists obtained 15 minutes later. L-NAME (10 μ M) was then added to the perfusion solution in addition to indomethacin, and the dose-response curves to the agonists constructed again. At least five experiments were performed for each treatment group. In a separate set of experiments, the order of infusion of enzyme inhibitors was reversed.

2.3 Drugs

Noradrenaline, indomethacin and *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Endothelin-1, *endothelin-3* and IRL 1620 were obtained from the Peptide Institute (Osaka, Japan). FR 139317 and BQ-788 were synthesized in house. Sodium pentobarbital (Sagatal) was obtained from May & Baker (Dagenham, U.K.). Heparin was obtained from Roche (São Paulo, SP, Brazil).

Noradrenalin, endothelin-1, L-NAME and indomethacin were dissolved in Krebs solution prior to injection. The composition of the Krebs solution was (mM): NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.17, CaCl₂ 2.5 and glucose 5.6. FR 139317 (stock solution of 150 µM) was dissolved in 1 N NaOH and the pH corrected to 7.4. Drugs were administered by either continuous infusion into both hepatic artery and/or portal vein lines, or bolus injection directly into the portal inflow line. Bolus injections were of 1.0 ml and were immediately washed in with 1.0 ml of Krebs solution to provide a constant injectate of 2.0 ml.

2.4 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± s.e.m. Comparison of means were made using Student's paired *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls post test, where appropriate. Differences were considered significant when *p*<0.05.

3. Results

3.1.1 Portal vascular responses to intraportal ET-1, IRL 1620 and NA. Under control conditions, the mean hepatic arterial perfusion pressure was 29.0 ± 2.6 mmHg, and the mean portal perfusion pressure was 3.6 ± 0.4 mmHg. Hepatic arterial inflow resistance was 1.24 ± 0.06 mmHg.ml⁻¹.min, while portal inflow resistance was 0.12 ± 0.01 mmHg.ml⁻¹.min. This ratio of hepatic arterial to hepatic portal inflow resistances of 10 is similar to that reported previously in the dog (Richardson & Withrington, 1978).

Intraportal administration of NA (5-50 nmol), ET-1 (40 - 400 pmol) and IRL 1620 (100-1000 pmol) resulted in dose-dependent increases in portal perfusion pressure (Figure 1). The time course of the portal responses of the three agonists was different, the responses to ET-1 being long-lasting relative to the responses to NA and IRL 1620 (Figure 1). At constant portal inflow, these changes in portal pressure reflect an increase in portal inflow resistance (Figure 2, Table 1). Over the molar dose range investigated, the two agonists, ET-1 and IRL 1620, were equipotent in elevating hepatic portal vascular resistance.

3.1.2 Portal responses to intra-arterial administration of ET-1, ET-3, IRL 1620. All three agonists increased hepatic arterial inflow resistance and, in addition, caused simultaneous increases in portal vascular resistance (Figure 3). These differential changes in the hepatic inflow vascular resistances were particularly marked for the intra-arterial administration of the selective ET_B agonist, IRL 1620, and the predominant ET_B agonist, ET-3, since substantial increases in

portal vascular resistance occurred accompanied by very small changes in the arterial circuit, reflecting the different ET receptor profile of the two hepatic inflow channels.

3.2 Effects of selective endothelin receptor antagonists. Portal vasoconstrictor responses to intraportal injection of ET-1, IRL 1620 and NA were determined before and during the intraportal infusion of the selective ET_A receptor antagonist, FR 139317 (0.3 μ M), and/or the selective ET_B receptor antagonist, BQ-788 (0.3 μ M). At the doses used, neither FR 139317 nor BQ-788 affected the basal portal vascular resistance when added to the perfusion medium. The portal vascular responses to all intraportal doses of ET-1 were significantly reduced during the infusion of FR 139317 (Figure 4a). Addition of BQ-788 to the perfusion solution medium further diminished the portal responses to ET-1, although this reduction in portal response was not significantly different from the responses obtained during FR 139317 infusion alone (Figure 4a). Administration of BQ-788 prior to FR 139317 reduces responses to ET-1 (Figure 4b), but not significantly. However, subsequent addition of FR 139317 resulted in a significant reduction in portal inflow resistance changes following injection of endothelin-1 (Figure 4b). These observations indicate that ET_A receptors predominantly mediate the portal vascular responses to ET-1 in the isolated perfused canine liver.

The portal vascular responses to intraportal IRL 1620 were almost completely abolished by treatment with BQ-788 (0.3 μ M, Figure 5a). Concomitant addition of FR 139317 (0.3 μ M) to the perfusion medium further

reduced the portal vasoconstrictor response to the highest dose of IRL 1620 ($p < 0.05$, Figure 5a). Treatment with FR 139317 alone did not significantly affect the vascular responses to IRL 1620 (Figure 5b). However, subsequent addition of BQ-788 together with FR 139317 significantly ($p < 0.01$) reduced the increase in portal inflow resistance following injection of the selective ET_B receptor agonist (Figure 5b).

Perfusion of the preparation with FR 139317, BQ-788 or combination of both did not modify the portal vascular responses to NA (50 nmol); data not shown.

3.3 Effects of cyclo-oxygenase and NO synthase inhibition. Continuous intraportal and intraarterial perfusion with indomethacin or L-NAME did not significantly affect basal portal inflow resistance (0.5 ± 0.3 mmHg.ml⁻¹.min and 0.15 ± 0.02 mmHg.ml⁻¹.min, respectively).

Under control conditions, intraportal administration of ET-1, IRL 1620 and NA resulted in dose-dependent increases in portal inflow resistance (Table 1, Figures 6a, b and c).

3.3.1 Indomethacin. Indomethacin treatment (5.6 μ M) alone significantly ($p < 0.05$) augmented portal inflow resistance changes in response to the higher doses of intraportal ET-1 and NA (Table 1). In contrast, the portal vascular response to any dose of IRL 1620 was not affected significantly by indomethacin treatment (Table 1).

3.3.2 *L-NAME*. Intraportal and intraarterial perfusion with the NOS inhibitor L-NAME alone significantly ($P<0.05$) potentiated the increase in hepatic portal vascular resistance due to both intraportal ET-1 and NA injection (Figure 6a and 6c), but not the response following the administration of IRL 1620 (Figure 6b).

3.3.3 *L-NAME and indomethacin*. Combined NO synthase and cyclooxygenase inhibition with L-NAME and indomethacin significantly increased the portal responses to both intraportal ET-1 (Figure 6a) and NA (Figure 6c). The addition of indomethacin to L-NAME significantly increased the portal response to ET-1 above that response obtained to L-NAME alone (Figure 6a). In contrast, the portal response to IRL 1620 was not significantly changed by infusion of indomethacin alone (Table 1), L-NAME alone (Figure 6b) or the combination of both indomethacin and L-NAME (Figure 6b).

4. Discussion

The response of any vascular bed to endothelin agonists depends upon the distribution of ET_A and ET_B receptors and intrinsic efficacy of the agonists. In the present experiment in the isolated perfused canine liver, the use of selective, and mixed, ET agonists has revealed the presence of both ET_A and ET_B receptors in the hepatic portal vascular bed; both of which when activated elicit an increase in portal inflow resistance. The presence of these receptor population has been further validated by the use of selective ET_A (FR 139317) and ET_B (BQ-788) receptor antagonists. Previous work describing the distribution of receptors in the hepatic portal vasculature has provided contradictory reports. Zhang et al., (1995) reported that, in the isolated perfused rat liver, ET_A antagonism exerted no significant effects on whole organ haemodynamic changes to ET-1 and, furthermore, ET_B antagonist significantly inhibited the increase in portal pressure accompanying ET-1 infusion. In contrast, Zhang et al. (1997) again using a rat liver model found that neither ET_A nor ET_B antagonism completely inhibited the portal response of ET-1; however the two antagonists together did. The discrepancy between these two sets of observations may lie in the use of antagonists of different selectivity and stability.

Our observations in the canine hepatic portal circuit are in contrast to previous studies (Faro et al., 1996) in the canine arterial system where a distribution of ET_A receptors only could be demonstrated since the selective ET_B agonist, IRL 1620, "failed to affect the hepatic arterial vascular resistance even at the highest dose used (1.2nmol)" indicating a total absence of ET_B receptors. In

addition we have demonstrated that the ET_A and ET_B receptors situated within the portal inflow circuit and potentially able to alter portal inflow haemodynamic can be activated by agonists not only in the portal inflow but also by access from the arterial inflow. In the present experiments a selective ET_B agonist (IRL 1620; Takai et al., 1992) and ET-3, when administered intra-arterially, caused marked increases in the hepatic portal vascular resistance without significant changes in arterial inflow. Such arterial-portal interactions have been described previously in the dog (Richardson & Withrington, 1978) and confirmed in other species. Therefore, total liver blood flow and its differential distribution between hepatic arterial and portal compartments may be determined by the activity of both ET_A and ET_B receptors as the results of local and systemic release of the appropriate ET agonists.

The functional implications of these arterial-portal interactions is substantial since it proposes that elevated systemic arterial levels of ET_B agonists such as ET-1 and ET-3 may increase hepatic portal vascular resistance without necessarily entering the liver in the portal inflow. Elevated systemic levels of partial ET_B agonists (ET-1/ET-3) have been reported in various diseases states associated with liver dysfunction and/or portal hypertension. Moller et al. (1995) described that hepatic venous and femoral arterial levels of ET-1 and ET-3 were significantly higher in cirrhosis and that compared with normal there was elevated hepato-splanchnic release of ET-1 and ET-3. Clearly, some component of the disordered hepatic haemodynamics seen in clinical situations could rise

from elevated systemic levels of ET_B agonist provoking reduced hepatic portal perfusion.

In the present study the portal vasoconstrictor responses to ET_A activation were modified by concomitant NO and eicosanoid release (de Nucci *et al.*, 1988) since inhibitors of the enzymes nitric oxide synthase (L-NAME) and cyclooxygenase (indomethacin) significantly potentiated the increase in portal resistance caused by administration of ET-1. These observations are especially relevant since Battista *et al.*, (1997) has reported elevated levels of NO, measured directly, in the portal vein compared with a peripheral vein and, more significantly, levels in the hepatic vein elevated compared with the portal vein, indicating NO synthesis and release within the liver.

This potentiation following cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition was not apparent for the portal vascular response to ET_B activation by the agonist IRL-1620. This may reflect the spatial location of the ET_B receptor sites within the liver and their vicinity to endothelial sources of NO and PGI₂. Recent studies have examined the distribution of ET_A and ET_B receptors among the cell population of the liver (Housset *et al.*, 1993) and revealed that the greatest density of ET_B receptors resides on the perisinusoidal lipocytes (Ito or stellate cells), which upon activation have structural features similar to smooth muscle cells. Moreover, isolated lipocytes from both normal rat liver (Rockey, 1995) and a model of hepatic fibrosis (Rockey & Weisinger, 1996) contract in response to addition of ET-1 and the selective ET_B agonist, sarafotoxin 6c. These cells may therefore influence portal haemodynamics by mechanical

restriction, consequently increasing the resistance of the low pressure system of portal inflow channels.

In conclusion, our own studies using the canine liver perfusion are unequivocal; ET_A receptors modulate the hepatic arterial resistance whilst both ET_A and ET_B receptors can influence portal inflow resistance.

References

- Arai H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo and Makanishi S, 1990, Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, 730.
- Battista S., F. Bar, G. Mengozzi, E. Zanon, M. Ciroso and G. Molino, 1997, Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. *J. Hepatol.* 26, 75.
- Clozel M., G. A. Gray, W. Breu, B-M. Loffler and R. Oster-Walder, 1992, The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 867.
- Faro R., D.M. Grassi-Kassisse, J. L. Donato, I. Boin, T. J. Opgenorth, P. G. Withrington, R. Zatz, E. Antunes and G. de Nucci, 1995, Role of endothelin ET_A and ET_B receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl. 3),S204.
- Inoue A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kassuya, T. Miyachi, K. Goto and T. Masaki, 1989, The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2863.
- Moller S., V. Gulberg, J. H. Henriksen and A. L. Gerbes, 1995, Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *J. Hepatol.* 23, 135.

- De Nucci G., R. Thomas, P. D'Orleans-Juste, E. Antunes, C. Walder, T. Warner and J. R. Vane, 1988, 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. USA* 85, 9797.
- Okumura M., Y. Takei, S. Kawano, K. Nagano, E. Masuda, M. Goto, S. Tsuji, T. Michida, SS. Chen, T. Kashiwagi, T. Kamada and N. Sato, 1994, Vasoactive effect of endothelin-1 on rat liver in vivo. *Hepatology* 19, 155.
- Opgenorth T.J., 1995, Endothelin receptor antagonism. *Adv. Pharmacol.* 33, 1.
- Richardson P. D. I. and P. G. Withrington, 1978, Pressure-flow relationships and effects of noradrenaline and isoprenaline on hepatic arterial and portal venous vascular beds of dog. *J. Physiol.* 282, 451.
- Rockey D.C., 1995, Characterization of endothelin receptors mediating rat stellate cell contraction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 207, 725.
- Rockey D. C. and R. A. Weisiger, 1996, Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 24, 233.
- Sumner M.J., T. R. Cannon, J. W. Mundin, D. G. White and I. S. Watts, 1992, Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.* 107, 58.
- Takai M., I. Umemura, K. Yamasaki, T. Watakabe, Y. Fujitani, K. Oda, Y. Urade T. Inui, T. Yamamura and T. Okada, 1992, A potent and specific agonist, Suc-

- [Glu9,Ala11,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 953.
- Warner T. D., G. H. Allcock, R. Corder and Vane JR, 1993, Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.* 110, 777.
- Withrington P. G., G. de Nucci and J. R. Vane, 1989, Endothelin-1 causes vasoconstriction and vasodilation in the blood perfused liver of the dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13, S209.
- Yanagisawa M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki, 1988, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 323, 411.
- Zhang B., Y. Calmus, L. Wen, P. Sogni, S. Lotersztajn, D. Houssin and B. Weill, 1997, Endothelin-1 induces liver vasoconstriction through both ETA and ETB receptors. *J. Hepatol.* 26, 1104.
- Zhang J.X., M. Bauer and M. G. Clemens, 1995, Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. *Am. J. Physiol.* 269, G269.

Table 1 - Effects of prostaglandin inhibition with indomethacin on portal vascular responses to endothelin-1, IRL 1620 and noradrenaline in the isolated perfused canine liver

	endothelin-1 (pmol)			IRL 1620 (pmol)			noradrenaline (nmol)		
	40	100	400	100	400	1000	5	15	50
Control	0.004 ± 0.004	0.002 ± 0.002	0.022 ± 0.005	0.008 ± 0.005	0.018 ± 0.008	0.045 ± 0.016	-0.005 ± 0.02	-0.011 ± 0.025	0.013 ± 0.006
Indo (5.6 µM)	0.020 ± 0.007	0.013 ± 0.007	0.182 ± 0.070*	0.030 ± 0.014	0.032 ± 0.013	0.053 ± 0.018	0.032 ± 0.01	0.095 ± 0.022*	0.117 ± 0.036*

The portal vascular responses are expressed as absolute changes (delta) in portal inflow resistance (mmHg.ml⁻¹.min) following administration of different agonists. *p<0.05 vs. control

Figure 1

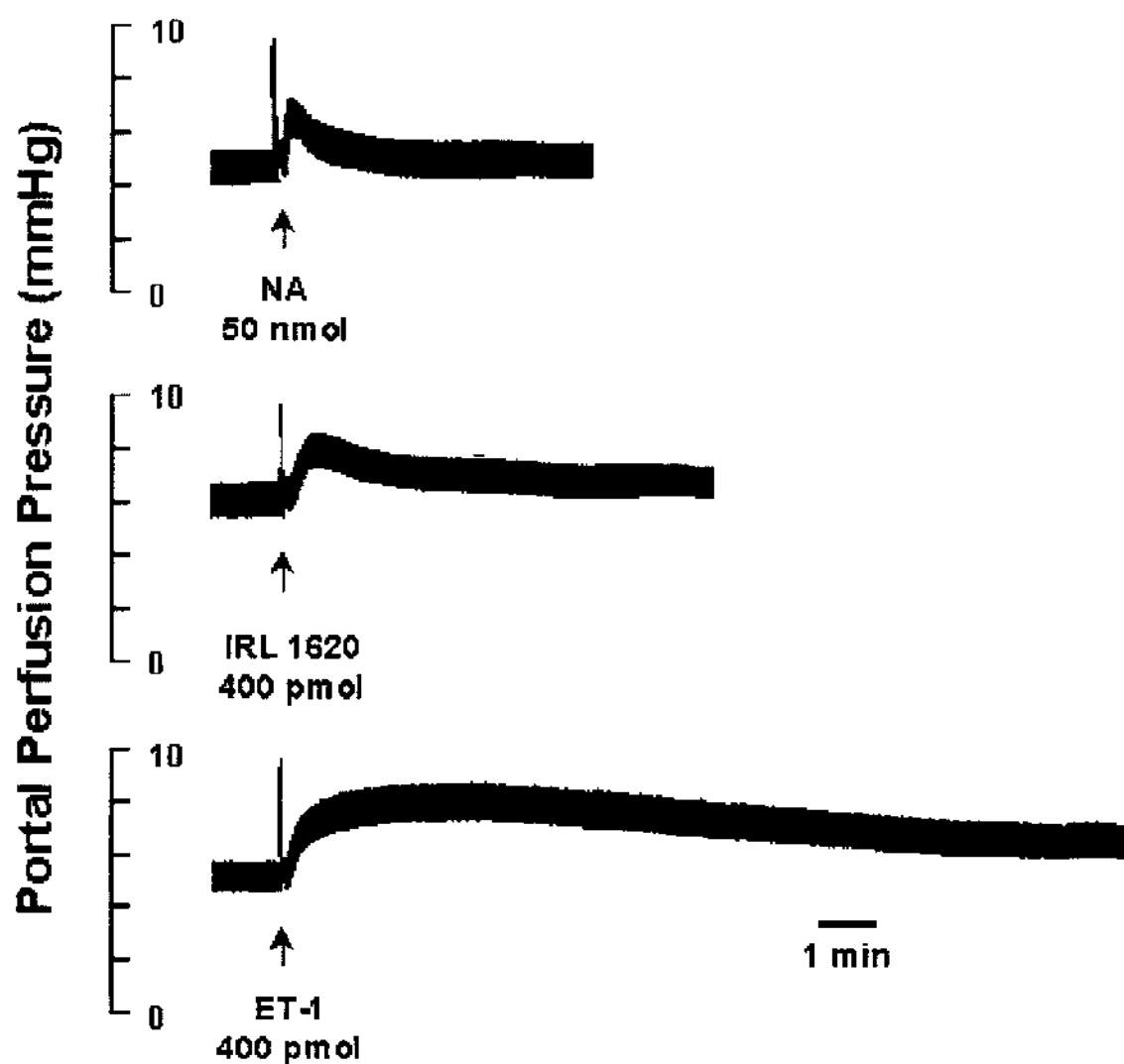


Figure 1: Canine liver perfusion tracing illustrating the portal vascular responses to intraportal administration of (a) noradrenaline (NA), (b) IRL 1620 and (c) endothelin-1 (ET-1). All three agonists increased hepatic portal venous pressure and therefore hepatic portal inflow resistance, but had different time-courses of response; ET-1 produced the most prolonged duration of action.

Figure 2

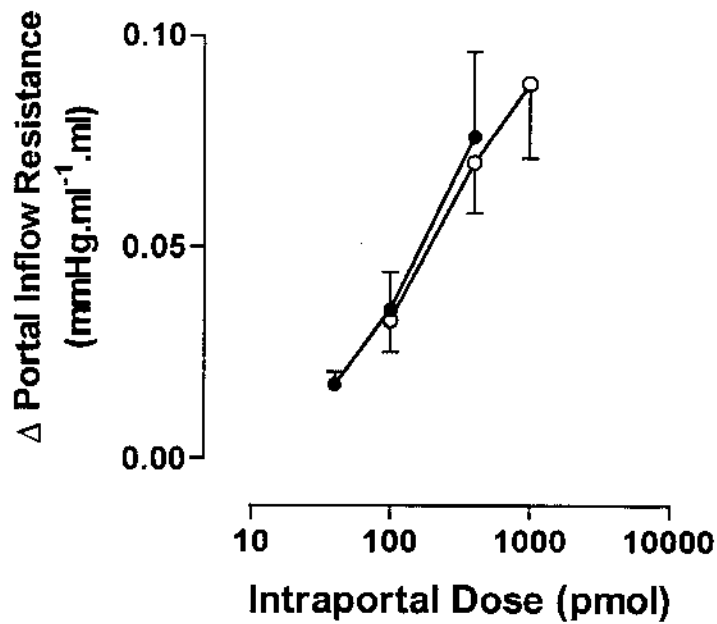


Figure 2: Effects of intraportal administration of endothelin-1 (solid circles) and IRL 1620 (open circles) on portal vascular resistance, expressed as absolute changes ($\text{mmHg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}$). Both peptides significantly ($p < 0.05$) increased portal vascular resistance in a dose-dependent manner.

Figure 3

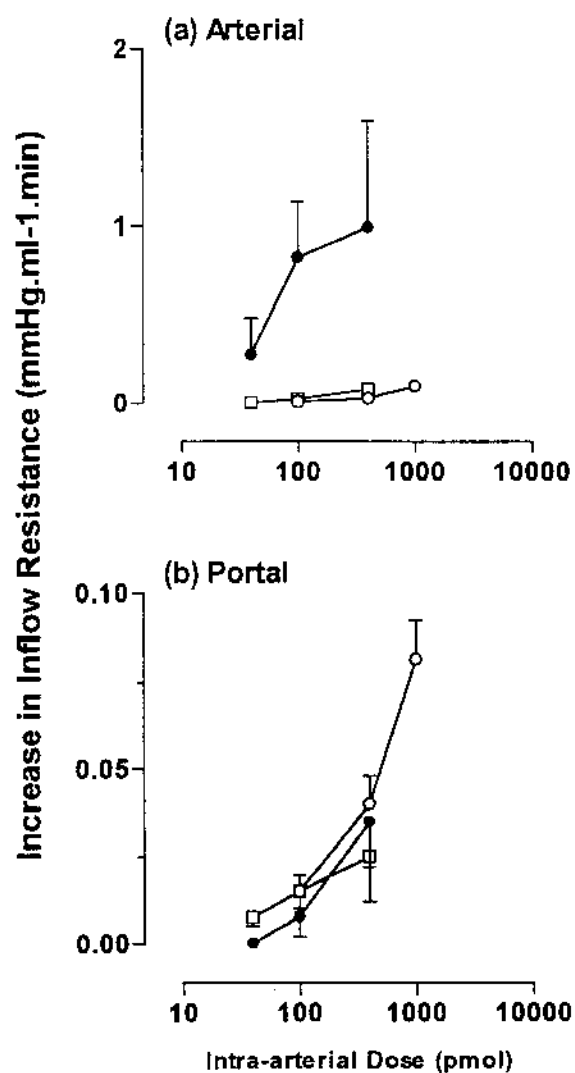


Figure 3: Simultaneous changes in hepatic (a) arterial and (b) portal inflow resistance to the intra-arterial administration of ET agonists, ET-1 (solid circles), ET-3 (open squares) and IRL 1620 (open circles). The difference in receptor population of the two liver inflow circuits is clearly demonstrated.

Figure 4

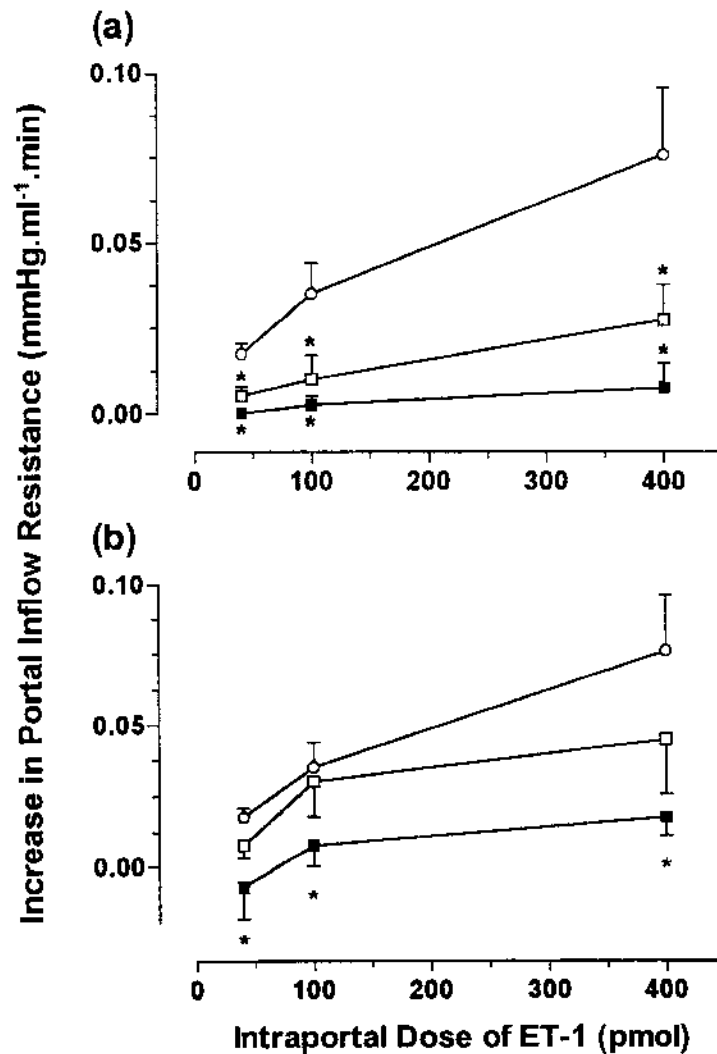


Figure 4: (a) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal ET-1 before (open circles), during ET_A antagonism alone (open squares, FR 139317) and both ET_A and ET_B antagonism (solid squares, FR 139317 and BQ-788). (b) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal ET-1 before (open circles), during ET_B antagonism alone (open squares, BQ-788) and both ET_A and ET_B antagonism (solid squares, BQ-788 and FR 139317). Asterisks denote significant difference from control (*p<0.05). ET_A antagonism (FR 139317), but not ET_B antagonism (BQ-788) significantly reduced the increase in hepatic portal vascular resistance to ET-1.

Figure 5

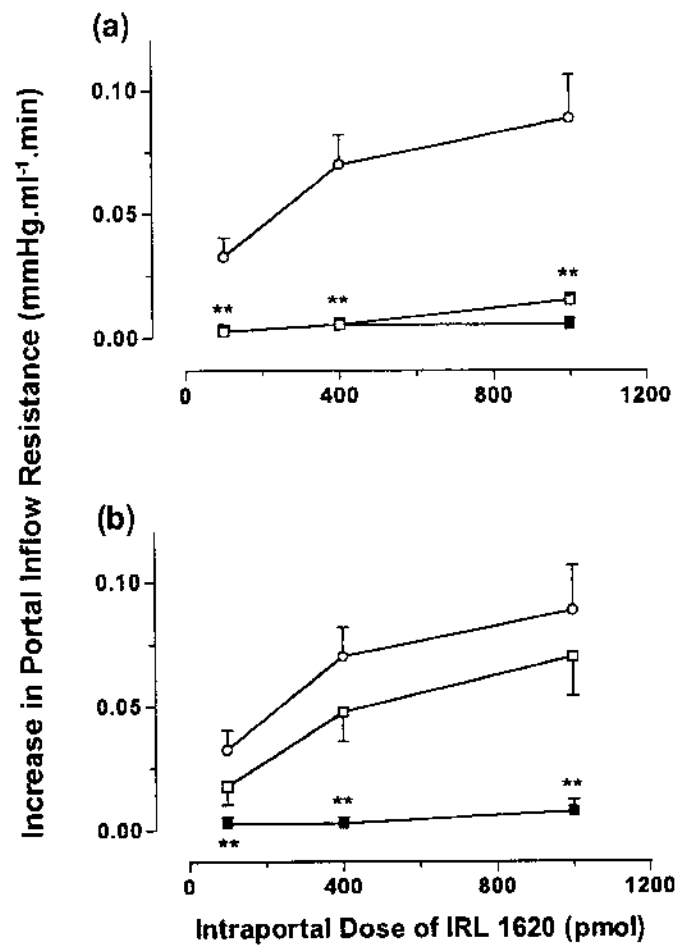


Figure 5: (a) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal IRL 1620 before (open circles), during ET_B antagonism alone (open squares, BQ-788) and both ET_A and ET_B antagonism (solid squares, BQ-788 and FR 139317). (b) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal IRL 1620 before (open circles), during ET_A antagonism alone (open squares, FR 139317) and both ET_A and ET_B antagonism (solid squares, FR 139317 and BQ-788). Asterisks denote significant difference from control (*p<0.05). ET_B antagonism (BQ-788), but not ET_A antagonism (FR 139317) significantly reduced the increase in hepatic portal vascular resistance to IRL 1620.

Figure 6

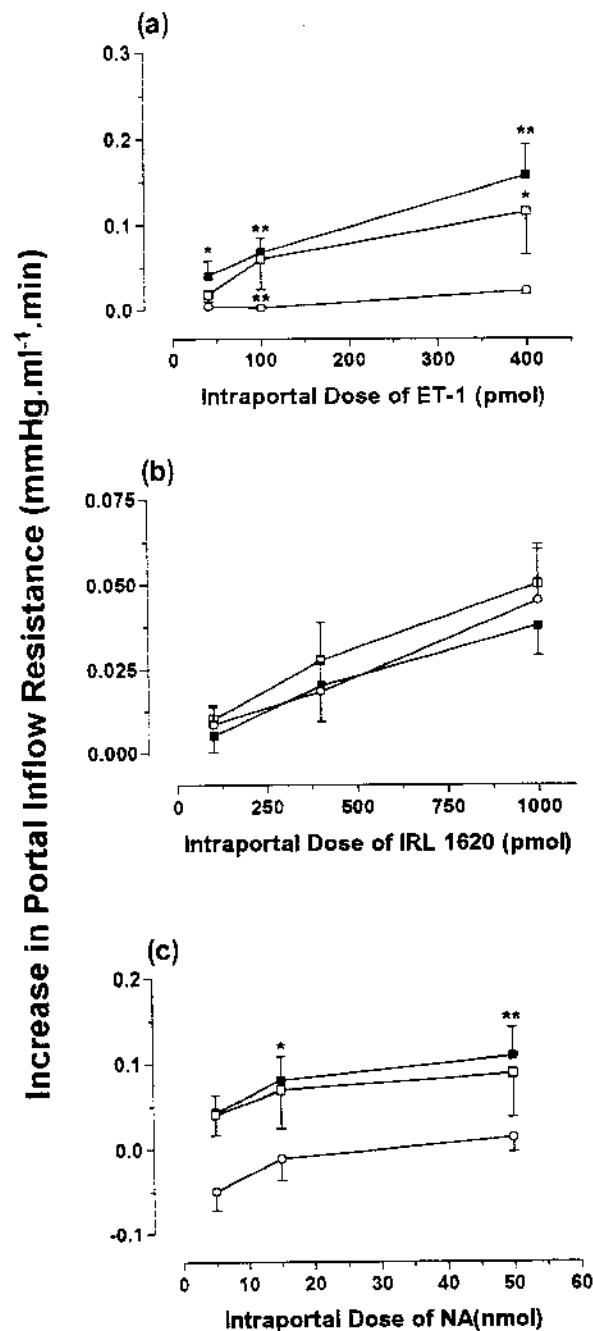


Figure 6: Increases in hepatic portal vascular resistance in response to intraportal injection of (a) ET-1, (b) IRL 1620, and (c) NA under control conditions (open circles), during infusion of L-NAME (open squares) and both L-NAME and indomethacin (solid squares). Asterisks denote significant difference from control (*p<0.05, **p<0.01). Blockade of NO and prostaglandin synthesis by continuous perfusion with L-NAME (10μM) and indomethacin (5.6μM) significantly (p<0.05) augmented the endothelin-1- and noradrenaline-induced increase in portal inflow resistance, while not affecting IRL 1620-induced responses.

4 - DISCUSSÃO

A resistência vascular portal contribui para a manutenção do fluxo sanguíneo hepático e portal. Alterações na resistência do fluxo sanguíneo portal podem afetar o suprimento de sangue do fígado, bem como produzir alterações na regulação do fluxo sanguíneo esplâncnico. Por exemplo, aumento na resistência do fluxo sanguíneo portal, tem sido o fator desencadeante do desenvolvimento da hipertensão portal em pacientes com doenças crônicas do fígado, tais como cirrose ou esquistossomose. A hipertensão portal acarreta distúrbios severos do fluxo hemodinâmico gerando complicações no tratamento desta desordem (GROSZMAN et al., 1994)

Os mecanismos envolvidos no controle da resistência do fluxo sanguíneo portal ainda não estão completamente estabelecidos. Acredita-se que liberações contínuas de mediadores vasoativos tais como prostaglandinas, óxido nítrico, endotelinas e monóxido de carbono participam da regulação do fluxo sanguíneo portal (MITTAL et al., 1994; SUEMATSU et al., 1995). Estes mediadores podem ser produzidos por células de Kupfer e sinusoidais. Outros tipos celulares também podem participar deste processo em circunstâncias particulares. Por exemplo, tem-se demonstrado que células estreladas têm um importante papel na resistência do fluxo sanguíneo portal em ratos cirróticos (ROCKEY et al., 1996). Sob estimulação, estas células exibem propriedades contráteis que modulam o fluxo sinusoidal, sendo este efeito mediado por endotelinas (HOUSSET et al., 1992). Entretanto, os mecanismos pelos quais a endotelina modula a resistência vascular portal e os tipos de receptores endotelinérgicos envolvidos, não estão devidamente claros.

Os resultados desta pesquisa demonstraram a existência de receptores de endotelina farmacologicamente ativos na circulação portal canina. A ativação destes receptores com agonistas como endotelina-1 (agonista não seletivo de receptores ET_A/ET_B) ou IRL 1620 (agonista seletivo de receptores ET_B), produziram aumento da pressão portal dependente da dose, refletindo em aumento da resistência do fluxo portal. Estes resultados sugerem que ambos receptores ET_A e ET_B estão presentes e funcionalmente ativos na circulação portal do fígado canino. Isto está apoiado no fato que:

a) a inibição da ativação de receptores ET_A com antagonista seletivo de receptores ET_A , FR 139317, reduziu significativamente o efeito pressor da endotelina-1 na circulação portal;

b) a administração do antagonista seletivo de receptores ET_B , BQ 788, reduziu (ainda que de forma discreta) o efeito pressor induzido pela endotelina-1;

c) a administração de um agonista seletivo de receptores ET_B , IRL 1620, produziu um aumento dose dependente na pressão de perfusão portal, efeito este abolido completamente pelo antagonista seletivo de receptores ET_B , BQ 788.

Estes achados indicam que, de fato, os receptores ET_B são funcionalmente ativos na circulação portal. Sob ativação, estes receptores podem promover um significativo aumento da resistência do fluxo portal. Observações anteriores mostraram que em leito arterial hepático, o IRL 1620 causa aumentos discretos na resistência do fluxo arterial vascular, sugerindo que a população de receptores de endotelina no leito arterial de fígado canino é

constituída predominantemente por receptores ET_A (FARO et al., 1995) Além disso, ficou estabelecido que receptores ET_A não participavam das respostas vasculares portais induzidas pela endotelina-1 em fígado de rato (ROCKEY et al., 1996). Portanto, os resultados sugerem que há uma população diferencial de receptores de endotelina no sistema vascular e arterial do fígado canino, e que há marcada diferença no leito vascular entre fígado de rato e cão com relação a estes receptores.

A vasoconstrição portal causada em resposta à administração de endotelina-1 foi significativamente potencializada pela inibição da síntese de prostaglandinas e óxido nítrico, sugerindo que as respostas vasoconstritoras destes agonistas são moduladas pela liberação concomitante dos vasodilatadores eicosanóides e NO. Potencialização similar das respostas de endotelina-1, foram observadas anteriormente em outros leitos vasculares, incluindo o sistema arterial do fígado e do baço de cão (FARO et al., 1995; GRASSI-KASSISSE et al., 1994). Em contraste, a resposta vasoconstritora ao IRL 1620 não foi significativamente modificada pela inibição da síntese de prostaglandinas ou NO, indicando que modulam eventos mediados pela ativação de receptores ET_A na circulação portal de fígado canino.

A distribuição diferencial de tipos de receptores de endotelina entre os leitos circulatórios arterial e portal sugerem um controle diferencial pelos antagonistas seletivos de receptores ET_A e ET_B na redução da resistência do fluxo portal. Evidências sugerem que endotelina-1 pode modular o fluxo sanguíneo hepático (OKUMURA et al., 1994; ZHANG et al., 1994). Além disso,

elevados níveis de endotelina-1 e endotelina-3 estão associados com hipertensão portal em pacientes cirróticos, o que poderia contribuir para o aumento da resistência do fluxo da veia porta em fígado cirrótico (SALÓ et al., 1995; TSAI et al., 1995). Em adição, a ativação de receptores ET_B tem sido associada à atividade contrátil de células estreladas de fígado de rato cirrótico resultando em aumento da resistência do fluxo sanguíneo portal (ROCKEY et al., 1996). Já que a abundância de receptores ET_B em fígado cirrótico parece estar estabelecida, a existência de receptores ET_B farmacologicamente ativos no leito vascular portal proporcionaria uma terapêutica potencial para administração de um antagonista ET_B que reduz a vasoconstrição portal devido a liberação de endotelina-1 e endotelina-3 em cirroses associada com hipertensão portal, sem comprometimento do suprimento arterial hepático

Concluindo, foi demonstrado que no leito portal de fígado canino há uma população mista de receptores de endotelina. A existência de receptores de endotelina funcionalmente ativos pode mediar, pelo menos em parte, a regulação da resistência vascular portal. Outrossim, o antagonismo da ativação de receptores de endotelina poderia tornar-se potencialmente benéfico no tratamento da hipertensão portal. Por outro lado, a inibição da síntese endógena do óxido nítrico e de prostaglandinas pode ter conseqüências deletérias nesse processo.

5. CONCLUSÕES

- Neste trabalho investigou-se o efeito de antagonistas de receptores de endotelina ET_A (FR139317) e ET_B (BQ788) sobre as respostas vasculares hepáticas induzidas pela endotelina-1 (agonista ET_A/ET_B), ET-3 (agonista ET_B) e IRL1620 (agonista ET_B) em fígado isolado de cão. Foi também estudado a participação do óxido nítrico e prostaglandinas sobre as alterações vasculares induzidas pela endotelina-1 e IRL1620.
- A injeção intra-portal da endotelina-1 e o IRL1620 causou aumento dependente da dose na resistência ao fluxo vascular portal sendo ambos equipotentes com relação a este efeito. Contudo, os efeitos vasoconstritores da endotelina-1 foram mais prolongados em relação àqueles induzidos pelo IRL1620. O FR139317 e o BQ788 reduziram significativamente o aumento da resistência portal induzido pela endotelina-1 e IRL1620, respectivamente;
- O bloqueio da síntese de prostaglandinas e óxido nítrico através do uso de indometacina e L-NAME, respectivamente, potencializou as respostas vasculares portais induzidas pela endotelina-1, mas não pelo IRL1620;
- Os resultados indicam que a circulação portal do cão possui população mista de receptores de endotelina (ET_A e ET_B). A vasoconstrição portal induzida pela endotelina-1 parece ser mediada pela ativação de receptores ET_A e ET_B e modulada pela liberação concomitante de prostaglandinas e óxido nítrico;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-LATIFE, A. A. & ZHANG, Y. - Species differences in effects of endothelin-1 on myo-inositol triphosphate accumulation , cyclic AMP formation and concentration of isolated iris sphincter of rabbit and oothermammalian species. **Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.**, 32:2432-8, 1991.
- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H. & MAKANISHI, S. -. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, 348:730-732, 1990.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. - Nitric oxide directly activates clcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368:850-3, 1994.
- BILLIAR, T. R.; CURRAN, R. D.; STUHER, D. J.; STADLER, J.; SIMMONS, R. L.; MURRAY, S. A. - Inducible citosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-arginine in hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 168:1034-40, 1990.
- 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.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWEINSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. - Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, 351:714-8. 1991.
- BUSSE, R. & MULSCH, A. - Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth cells. **FEBS Lett.**, 275:87-90. 1990.
- CHEN, G & SUZUKI, H. - Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. **J. Physiol.**, 410:91-106, 1989.
- CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANADAN, D. - Role of endothelia cells in relaxation of isolated arteries by bradkinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 79:2106-10, 1982.

- COCKS, T. M. & ANGUS, J. A. - Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature**, 305:627-30, 1983.
- DAVENPORT, A. P. & MAGUIRRE, J. J. - Is endothelium-induced vasoconstriction mediated only by ET_A receptors in humans? **Trends Pharmacol. Sci.**, 15:9-11, 1994.
- DE NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLEANS-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.**, 85:9797-9800, 1988a.
- 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.**, 85:2334-38, 1988b.
- D'ORLEANS-JUSTE, P.; LIDBURY, P. S.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. - 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.**, 263:261-4, 1990.
- EMOTO, N.; YANAGISAEWA, M. - Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. **J. Biol. Chem.**, 270:15259-68, 1995.
- FARO, R.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; DONATO, J. L.; BOIN, I.; OPGENORTH, T. J.; WITHRINGTON, P. G.; ZATZ, R.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. - Role of endothelin ET_A and ET_B receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26(suppl. 3):S204-S207, 1995.

- FELETOU, M. & VANHOUTTE, P. M.- Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, 93:515-24, 1988.
- FILEP, J. G.; ROSSEAU, A.; SIROIS, P. - Structure-activity relationship of analogs of endothelin-1: dissociation of hypotensive and pressor actions. **Eur. J. Pharmacol.**, 220:263-6, 1992.
- FORSTERMANN, U.; NAKANE, M.; TRACEY, W. R.; POLLOCK, J. S. - Isoforms of nitric oxide synthase: Functions in the cardiovascular system. **Eur. Heart J.**, 14(Suppl I):10-15, 1993.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V.- The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288:373-376, 1980.
- FURCHGOTT, R. F. - Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, 53:557-73, 1983.
- FUKUTO, J. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; IGNARRO, L. J. - N^ω amino L-arginine: a new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 168:458-65, 1990.
- 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 sarafotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 100:158-62, 1990a.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNETT, T. - Regional haemodynamic effects of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. **Br. J. Pharmacol.**, 101:625-31, 1990b.
- GELLER, D. A.; LOWENSTEIN, C. J.; SHAPIRO, R. A.; NUSSLER, A. K.; DI SILVIO, M.; WANG, S. C.; NAKAYAMA, D. K.; SIMMONS, R. L.; SNYDER, S. H.; BILLIAR, T. R. - Molecular cloning and expression of inducible nitric

- oxide synthase from human hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90:349-5, 1993.
- 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.
- GORMAN, R. R.; BUNTING, S.; MILLER, O. V. - Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). **Prostaglandins**, 13:377-88, 1977.
- 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.
- GRANSTAM, E.; WANG, L.; BILL, A. - Effects of endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) in the rabbit eye, role of prostaglandins. **Eur. J. Pharmacol.**, 194:217-23, 1991.
- 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.
- GRASSI-KASSISSE, D. M.; ANTUNES, E.; WITHRINGTON, P. G. & DE NUCCI, G. - Involvement of nitric oxide in the canine splenic microcirculation and smooth muscle capsule. *J. Autonomic Pharmacology*. **Br. J. Pharmacol.**, 282:57-63, 1995.
- GROSZMANN, R. J. - Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. **Hepatology**, 20:1359-63, 1994.
- 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.; BOTTING, R. M.; VANE J. R. - Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, 12:530-48, 1988.
- HARRISON, V.; RANDRIATSOA, A.; SCHOEFTER, P. - Heterogeneity of endothelin-sarfotoxin receptors mediating contraction of pig coronary artery. **Br. J Pharmacol.**, 105:511-3, 1992.
- HOLZMAN, S. - Endothelium-induced relaxation by acetyl choline associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, 8:409-19, 1982.
- HOUSSET, C. N.; ROCKEY, D.C.; BISSEL, D. M. - Endothelin receptors in the rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90:9266-70, 1992.
- HU, S.; KIM, H. S.; JENG, A. Y. - Dual action of endothlin-1 on the Ca^{2+} -activated K^+ chanel in smooth muscle cells of porcine coronary artery. **Eur. J. Pharmacol.**, 194:31-6, 1991.
- HUGGINS, J. P.; PELTON, J. T.; MILLER, R. C. - The structure and specificity of endothelin receptor: their importance in physiology and medicine. **Pharmacol. Ther.**, 59:55-123, 1993.
- IGNARRO, L.J.; GOLD, M. E.; BUGA, G. M.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S.; CHAUDHURI, G.; FRANKI, G.- Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. **Circ. Res.**, 1989.
- INOUE, A; YNAGISAWA, M; KIMURA, S.; KASSUYA, 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.
- ISHII, K.; CHANG, B.; KERWIN, J. F.; HUANG, Z. J.; MURAD, F. - N° -nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. **Eur. J. Pharmacol.**, 176:219-23, 1990.

- ITO, T. T.; OGAWA, K.; ENOMOTO, J.; HASHIMOTO, H.; KAI, J.; SATAKE, T. - Comparisson of effects of PGI₂ and PGE₁ on coronary systemic haemodynamics and on coronary arterial cyclic nucleotide levels in dogs. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.**, 7:641-6, 1980.
- KASSUYA, Y.; ISHIKAWA, T.; YNAGISAWA, 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.; KASSUYA, Y.; SAWAMURA, T.; SHINMI, O.; SUGITA, Y.; YNAGISAWA, M.; GOTO, K.; MASAKI, T. - Converion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essetial 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.; YNAGISAWA, M.; MASAKI, T. - Autoradiographic distribution in rat tissues of bindig sites for endothelin: a neuropeptide? **Am. J. Physiol.**, 256:R858-66, 1989.
- LE MOUNIER 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. & CORNWEL, T. L. - Towards an undertanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. **Blood Vessels**, 28:129-37, 1991.
- LINCOLN, T. M. & CORNWEL, T. L. - Intacellular cyclic GMP receptors proteins. **FASEB J.**, 7:328-38, 1993.
- LIPTON, S. A.; CHOI, Y-B.; PAN, Z-H.; LEI, S. Z.; CHEN, H-S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. - A redox-based

- mechanism for neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. **Nature**, 364:626-31, 1993.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; YENGAR, 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.; CUSACK, N. J.; CARLETON, J. S.; GORDON, J. L. - Specificity of p_2 -purinoceptor that mediates endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, 108:295-9, 1985a.
- MARTIN, W.; VILLANI, G. M.; DESINGARO, J.; FURCHGOTT, R. F. - Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by haemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 232:708-16, 1985b.
- MASAKI, T.; KIMURA, S.; YNAGISAWA, M.; GOTO, K. - Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. **Circulation**, 84:1457-68, 1991.
- MASUDA, Y.; MIYASAKI, H.; KONDOH, M.; WATANABE, H.; YNAGISAWA, M.; MASAKI, T.; MURAKAMI, K. - Two different forms of endothelin receptors in rat lung. **FEBS Lett.**, 257:208-10, 1989.
- McMILAN, K.; BREDT, D. S.; HIRACH, D. J.; SNYDER, S. H.; CLARK, J. E.; MATERS, B. S. S. - Cloned expressed rat cerebelar nitric oxid synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 89:1141-5, 1992.
- MILLER, R. C.; PELTON, J. T.; HUGGINS, J. P. - Endothelins - from the receptors to medicine. **Trends Pharmacol. Sci.**, 14:54-60, 1993.
- MINKES, R. K.; HIGUERA, T. R.; ROGERS, G. F.; SHELDON, E. A.; LANGSTON, M. A.; KADOWITZ, P. J. - Cardiovascular response to vasoactive intestinal contractor, a novel endothelin-like peptide. **Am. J. Physiol.**, 259:H1152-60, 1990.

- MITTAL, M. K.; GUPTA, T. K.; LEE, F. Y.; SIEBER, C. C.; GROSZMANN, R. J. - Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. **Am. J. Physiol.**, G416-G422, 1994
- MITCHELL, J. A.; DE NUCCI, G.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. - Alkaline buffers release EDRF from bovine cultured aortic endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, 103:1295-302, 1991.
- MOLENAR, P.; O'RIELLY, G.; SHARKEY, A.; KUC, R. E.; HARDIND, D. P.; PLUMPTON, C.; GRESHAM, A.; DAVENPORT, 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. and VANE, J.R. - Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.**, 30:293-331, 1979.
- 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. - The L-Arginine: nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand.**, 145:201-27, 1992
- MOORE, P. K.; AL-SAWAYEH, O. A.; CHONG, N. W. S.; EVANS, R. A.; GIBSON, A. -. L-N^o-Nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "*in vitro*". **Br. J. Pharmacol.**, 99:408-412, 1990.
- MORELAND, S.; Mc MULLEN, D.M.; ABBOA-OFFEI, B.; SEYMOR, A. - Evidence for a differential location of vasoconstrictor endothelin receptors in the vasculature. **Br. J. Pharmacol.**, 112:704-708, 1994.
- MULSCH, A. & BUSSE, R. - N^G -nitro-L-arginine (N^G-[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.

- MURRAY, K. J. - Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. **Pharmacol. Ther.** 47: 329 – 45, 1990.
- MURRY, J. J.; FRIDOVICH, I.; MACHOUL, R. G.; HAGEN, P. O. - Stabilization and partial characterization of endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelium cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 141:689-96, 1986.
- NAKAJO, S.; SUGIURA, M.; SNAJDAR, R. M.; BOEHM, F. H.; INAGAMI, T. - Solubilization and identification of human placental endothelin receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 177:34-9, 1989.
- 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.
- OKUMURA, M.; TAKEI, Y.; KAWANO, S.; NAGANO, K.; MASUDA, E.; GOTO, M.; TSUJI, S.; MICHIDA, T.; CHEN, S. S.; KASHIWAGI, T.; FUSAMOTO, H.; KAMADA T. and Sato, N. - Vasoactive effect of endothelin-1 on rat liver in vivo. **Hepatology** 19:155, 1994.
- PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327:524-26, 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.
- PALMER, R. M. J. & MONCADA, S. - A novel citrullin-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 158:348-52, 1989.

- PALMER, R. M. J.; HICKERY, M. S.; CHARLES, I. G.; MONCADA, S.; BAYLISS, M. T. - Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 193:398-405, 1993.
- 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.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. - Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87:10043-7, 1990.
- RAE, G. A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G. & VANE J.R. - Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13:S89-92, 1989.
- RAPAPORT, 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.
- RESINK, T. J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F. R. - Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157:1360-8, 1988.
- 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.

- ROBERTSON, B. E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M. T. - cGMP-dependent protein kinase activates calcium-activated K^+ channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, 265:C299-C303, 1993.
- ROCKEY, D. & WEISIGER, R. A. - Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. **Hepatology**, 24:233-240, 1996.
- ROSENKRANZ, B.; FISCHER, C.; WEIMER, K. E. and FROLICH, J. C. - Metabolism of prostacyclin and 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ in man. **J. Biol. Chem.**, 255:10194-98, 1980.
- 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.; TAKUWA, Y.; MIYAZAI, 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.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. - Molecular characterization of endothelin receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 13:103-8, 1992.
- SALÓ, J.; FRANCITORRA, A.; FOLLO, A.; NAVASA, M.; GINÉS, A.; JIMENEZ, W.; GINÉS, P.; et al. - Increased plasma endothelin in cirrhosis. Relationship with systemic endotoxemia and response to changes in effective blood volume. **J. Hepatology**, 22:389-398, 1995.
- SCHMIDT, H. W.; WITTFÖHT, 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.
- SCHVARTZ, I.; ITTOOP, O.; HAZUM, E. - Identification of endothelin receptors by chemical cross-linking. **Endocrinology**, 126:1829-33, 1990.

- SERRADEIL LE GAL, C.; JOUNEUX, 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 Ca^{+2} oscillations and activation of glycogenolysis. **J. Clin. Invest.**, 87:133-8, 1991.
- 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.
- SNELL, R. S. **Histologia clínica**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. p. 394.
- SNYDER, S. H. & BREDET, D. S. - Nitric oxide as a neuronal messengers. **Trends Pharmacol. Sci.**, 12:125-30, 1991.
- SNYDER, S. H. - Janus faces of nitric oxide. **Nature**, 364:577, 1993.
- STOJILKOVIC, S. S.; IIDA, T.; MERELLI, F.; CATT, H. J. - Calcium signaling and secretory responses in endothelin-stimulated anterior pituitary cells. **Mol. Pharmacol.**, 39:762-70, 1991.
- STUEHR, D. J.; CHO, H. J.; KON, N. S.; NATHAN, C. F. - Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: a FAD- and FMN- containing flavoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 88:7773-7, 1991.
- SUEMATSU, M.; GODA, N.; SANO, N.; KISHIWAGI, T.; EGAWA, T.; SHINODA, Y.; ISHIMURA, Y. - Carbon monoxide as and endogenous sinusoidal tone in the perfused rat liver. **J. Clin. Invest.**, 96:2431-2437, 1995.
- SUGIURA, M.; SNAJDAR, R. M.; SCHWARTZBERG, M.; BADR, K. F.; INAGAMI, T. - Identification of two types of specific endothelin receptors in rat mesangial cell. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 162:11396-4 1989.
- 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.
- TAKUWA, Y.; MASAKI, T.; YAMASHITA, K. - The effects of the endothelin family peptides on cultured osteoblastic cells from rat calvariae. **Biochem. Biophys. Res. Commun** , 170:998-1005, 1990.
- TANIGUSHI, J.; FURUKAWA, K. I.; SHIGEKAWA, M. - Maxi K channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate- dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. **Pflügers Arch.**, 423:167-72, 1993.
- TARE, M.; PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A.; NEILD, T. O.; DUSTING, G. J. - Hyperpolarization of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from endothelium. **Nature**, 346:69-71, 1990.
- TATESON, J. E.; MONCADA, S.; VANE, J. R. - Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentration in human platelets. **Prostaglandins**, 13:389-97, 1977.
- TODA, N. - Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamine in isolated arteries of dog. **Br. J. Pharmacol.**, 81:301-7, 1984.
- TRAN TI, T. A.; KAWADA, N.; DECKER, K. - Regulation of endothelin 1 action on the perfused rat liver. **FEBS Lett.**, 318:353-7, 1993.
- TSAI, Y. T.; LIN, H. C.; YANG, M. C.; LEE, F. Y.; HOU, M. C.; CHEN, L. S.; LEE, S. D. - Plasma endothelin levels in patients with cirrhosis and their relationships to the severity of cirrhosis and renal function. **J Hepatol.**, 23:681-688, 1995.
- VANHOUTTE, P. M. & BEER, B. - Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Wien Klin Wochenschr**, 103:405-11, 1991.

- 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 rat and rabbit. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13:S85-S88, 1989b.
- WATANABE, H.; MIYAZAKI, H.; KONDOH, M.; MASUDA, Y.; KIMURA, S.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; MURAKAMI, K. - Two distinct types of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 161:1252-9, 1989.
- WATSON, S. & GIRDLESTONE, D. - TIPS Receptor Nomenclature Supplement. **Trends Pharmacol. Sci.**, 14(Suppl.):14, 1993.
- WHITE, K. A. & MARLETTA, M. C. - Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. **Biochemistry**, 31:6627-31, 1992.
- WITHRINGTON, P. G.; DE NUCCI, G. & VANE, J. R. -. Endothelin-1 causes vasoconstriction and vasodilation in the blood perfused liver of the dogs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13:S209-S210, 1989.
- 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**, 323:411-15, 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, 1990.

- ZAWADZKI, J. V.; FURCHGOTT, R. F.; CHERRY, P. D. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. **Fed. Proc.** , 40:689, 1981.
- ZHANG, J. X.; PEGOLI, W. J.; CLEMENS, M. G. - Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. **Am. J. Physiol.**, 266:G624-G632, 1994.