

Flávio do Rego de Araújo Faro

**Respostas da Microcirculação
Hepática Canina *in vitro*
a Agonistas de Endotelina
após Tratamento Alcoólico Agudo**

Orientador : Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas

1998

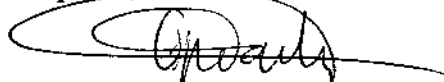


UNICAMP
Faculdade de Ciências Médicas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área de Farmacologia do Médico Veterinário Flávio do Rego de Araújo Faro.

Campinas, 14 de dezembro de 1998.



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

FLÁVIO DO REGO DE ARAÚJO FARO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Respostas da Microcirculação Hepática Canina *in vitro* a Agonistas de Endotelina após Tratamento Alcoólico Agudo

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
1998**

20002502

UNIDADE	8e
N.º CHAMADA:	T/1111/1111
V.	Ex.
TEMPO BC	40480
PROC.	248100
C	☐
D	☒
PREÇO	\$11,00
DATA	14/03/00
N.º CPD	

CM-00138924-4

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

F238r

Faro, Flávio do Rego de Araújo

Respostas da microcirculação hepática canina in vitro a agonistas de endotelina após tratamento alcoólico agudo / Flávio do Rego de Araújo Faro. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Gilberto de Nucci

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

1. Endotelina. 2. Fígado. 3. Etanol . I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

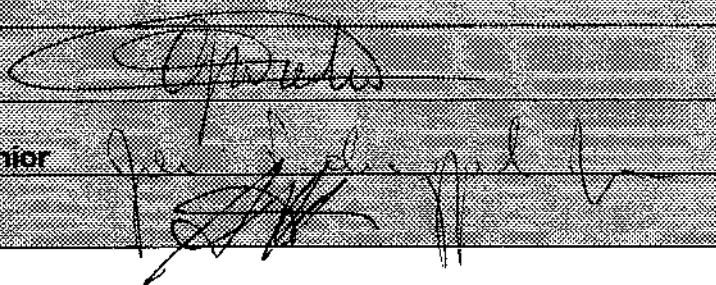
Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci

2. Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

3. Prof. Dr. Stephen Hyslop

Three handwritten signatures are present, corresponding to the three members of the exam board listed on the left. The first signature is for Prof. Dr. Gilberto de Nucci, the second for Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior, and the third for Prof. Dr. Stephen Hyslop.

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

Data: 14/12/98

Aos meus filhos **Flávio Venâncio** e **Raphael Henrique**, que souberam abdicar de minha presença e que, com certeza, serão beneficiados no decorrer do tempo.

Amo vocês

A minha querida **MÃE**, Marlene, que me apoiou em todos os momentos difíceis. Que demonstrou sua força em criar seus filhos sozinha e de ensiná-los o caminho. Amiga, confidente, a ela só posso dizer:

OBRIGADO POR EXISTIR.

OBRIGADO, MÃE.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela orientação, amizade e dedicação a mim dispensada.

Aos Drs. Edson Antunes, e Peter G. Withrington, pelo apoio, co-orientação e colaboração na viabilização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Geraldo P. Ferraz, pelo apoio técnico-científico e a paciência despendida no decorrer todo trabalho.

A meu irmão, Renato do R. A. Faro, pelo treinamento das técnicas utilizadas na preparação, pela amizade de longos 28 anos e pelo apoio constante.

Ao grande amigo, Cleber E. Teixeira, pelo apoio e amizade em todos os momentos adversos.

A Dra Lilian Mara Babadôpulus, pelo desprendimento com que se abdica de sua liberdade em benefício dos alunos

Ao amigo, Heryck J. Stella, pelas longas jornadas em que passamos juntos neste árduo trabalho.

A todos professores do Departamento de Farmacologia, pela amizade e participação direta ou indireta na conclusão deste trabalho.

A todos os técnicos do Departamento de Farmacologia, pelas pequenas colaborações que somadas são parcelas importante deste trabalho, com especial destaque para Agnaldo Fernando de Azevedo e Airtton 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, Alessandra, Alister, Claudia Franklin, Claudia Ferreira, Donato, Elen, Evandro, Heloisa, Jadson, Joaquim, José Eduardo, Heide, Leonardo, Lúcia, Luciana Bizeto, Luciana Nathan, Marcelo, Marcos 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 todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste projeto.

A FAPESP, pelo suporte financeiro.

E finalmente, com grande respeito e gratidão, aqueles que mesmo involuntariamente se tornaram peças fundamentais desde trabalho. **O CÃO**

**Mais do que de glórias, que são
passageiras, precisamos de
sentimentos de honra, que são
o apanágio de personalidades
verdadeiramente grandes**

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	VIII
Lista de tabelas	XI
Abstract	XII
Resumo	XIII

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Anatomofisiologia Hepática	01
1.2 - Anatomia hepática canina	06
1.3 - Farmacologia do álcool etílico (etanol)	07
1.3.1- Características e metabolização do etanol	07
1.3.2 - Ações sobre o SNC e sistema de neurotransmissão	11
A - Membrana Neuronal	12
B - GABA	12
C - Canais de cálcio	13
1.4 - Endotelina	13
1.5 - Óxido Nítrico (Fator de relaxamento derivado do endotélio)	22
1.6- Prostaciclina	25

2 - OBJETIVO 28

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Hepatectomia/Perfusão.....	29
3.2 - Efeitos do etanol	30
3.3 - A modulação das respostas por óxido nítrico e prostaglandinas.....	32
3.4 -Administração de agonistas de receptores de endotelina	33
3.5 - Administração de agonistas de receptores de endotelina em presença de tratamento alcoólico (100mM).....	34
3.6 - Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da Ciclooxygenase	35
3.7 - Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da óxido nítrico sintase.....	36

3.8 - Efeito do tratamento alcoólico contínuo com etanol (25mM).....	36
3.9 - Drogas utilizadas	38
3.10 - Análise estatística	38

4 - RESULTADOS

4.1 - Efeito do tratamento alcoólico agudo	39
4.2 - Tratamento da preparação com Indometacina	39
4.3 - Tratamento da preparação com L-NAME	40
4.4 - Efeito da administração contínua de etanol	41
4.5 - Respostas dos agonistas nos leitos vasculares hepáticos perfundidos com Krebs	42
4.5.1 - Endotelina -1	43
4.5.2 - IRL-1620	44
4.5.3 - Endotelina - 3	44
4.5.4 - Sarafotoxina-6c	44
4.5.5 - Sarafotoxina-6b	45
4.5.6 - Noradrenalina	45
4.6 - Administração de drogas em presença de tratamento alcoólico agudo (100mM)	46
4.6.1- Endotelina-1	46
4.6.2- IRL-1620	46
4.6.3- Endotelina-3	48
4.6.4- Sarafotoxina-6c	49
4.6.5- Sarafotoxina-6b	52
4.6.6 - Noradrenalina	54
4.7- Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100mM) na vigência da inibição da ciclooxigenase	57
4.7.1 - Endotelina-1	58
4.7.2 - IRL-1620	58
4.7.3 - Noradrenalina	58
4.8 - Respostas após tratamento alcoólico agudo (100mM) na vigência de inibição de Cicloxigenase.....	59

4.8.1 - Endotelina -1	59
4.8.2 - IRL-1620	60
4.8.3 - Noradrenalina	61
4.9 - Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100mM) na vigência da inibição da Óxido nítrico sintase	62
4.9.1 - Endotelina-1	63
4.9.2 - IRL-1620	63
4.9.3 - Noradrenalina	64
4.10 - Respostas após tratamento alcoólico agudo com etanol (100mM) na vigência da inibição da Óxido nítrico sintase	64
4.10.1 - Endotelina-1	64
4.10.2 - IRL-1620	65
4.10.3 - Noradrenalina	65
4.11- Administração de drogas em presença de tratamento alcoólico (25 mM) de maneira constante	66
4.11.1 - Endotelina-1	67
4.11.2 - IRL-1620	67
4.11.3 - Noradrenalina	68
4.12 - Respostas vasculares as administrações de drogas em presença de tratamento alcoólico (25mM) de maneira contínua	
4.12.1 - Endotelina-1	68
4.12.2 - IRL-1620	69
4.12.3 - Noradrenalina	70
5 - DISCUSSÃO	71
6 - CONCLUSÕES	78
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8 - APÊNDICE	99

LISTA DE FIGURAS

Fig	Pág	Título
01	02	Anatomia Hepática
02	05	Parte de um lóbulo hepático
03	10	Mecanismo de metabolização hepática do álcool.
04	15	Seqüência de aminoácidos das endotelinas e sarafotoxinas
05	16	Biossíntese da ET-1
06	18	Vias de transdução de sinais intracelulares ativados pelas endotelinas (ETs).
07	21	Mecanismo de ação da endotelina
08	30	Sistema de perfusão de fígado isolado
09	31	Esquema de protocolo experimental com etanol a 100 mM po 30minutos
10	32	Esquema de protocolo experimental perfusão alcoólica de 25 mM de modo constante
11	32	Esquema de protocolo experimental com inibidores de cicloxigenase e óxido nítrico sintase
12	35	Esquema representativo da administração de drogas em presença de tratamento alcoólico (100 mM)
13	35	Esquema representativo do tratamento alcoólico com etanol (100mM) na vigência da inibição da cicloxigenase
14	36	Esquema representativo do tratamento alcoólico com etanol (100mM) na vigência da inibição da oxido nítrico sintase
15	37	Esquema representativo do tratamento alcoólico agudo com etanol (25 mM) de maneira contínua

16	40	Gráficos das variações das resistências arterial e portal
17	41	Gráfico das variações das resistências arterial e portal (etanol 25 mM)
18	42	Traçado representativo do efeito da perfusão de etanol
19	47	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial de IRL-1620
20	47	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração portal de IRL-1620
21	48	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial de ET-3
22	48	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração portal de ET-3
23	50	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial de Sarafotoxina-6c
24	50	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração portal de Sarafotoxina-6c
25	51	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial e portal de IRL-1620 (1.000 pmol)
26	52	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial de Sarafotoxina-6b
27	53	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração portal de Sarafotoxina-6b
28	53	Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial e portal de ET-1 (400 pmol)
29	55	Traçados representativo dos efeitos das drogas no leito arterial
30	56	Traçados representativo dos efeitos das drogas no leito portal
31	60	Efeito do etanol sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial de IRL-1620 em presença de indometacina

- 32 61 Efeito do etanol sobre a resposta vascular induzida pela administração portal de IRL-1620 em presença de indometacina**
- 33 70 Efeito do etanol (25 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração arterial de IRL-1620**
- 34 70 Efeito do etanol (25 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração portal de IRL-1620**
- 35 77 Diversas ações do etanol na perfusão de fígado canino isolado**

LISTA DE TABELAS

Tab	Pág	Descrição
01	43	Dados iniciais para os experimentos com etanol (100 mM)
02	46	Resposta pressórica direta e indireta de ET-1
03	54	Resposta pressórica direta e indireta de NA
04	57	Dados iniciais para os experimentos com etanol (100 mM) adicionado o inibidor da cicloxigenase
05	59	Resposta pressórica direta e indireta de ET-1 em vigência do inibidor da cicloxigenase
06	61	Resposta pressórica direta e indireta de NA em vigência do inibidor da cicloxigenase
07	62	Dados iniciais para os experimentos com etanol (100 mM) adicionado o inibidor da óxido nítrico sintase
08	64	Resposta pressórica direta e indireta de ET-1 em vigência do inibidor da óxido nítrico sintase
09	65	Resposta pressórica direta e indireta de IRL-1620 em vigência do inibidor da óxido nítrico sintase
10	66	Resposta pressórica direta e indireta de NA em vigência do inibidor da óxido nítrico sintase
11	67	Dados iniciais para os experimentos com etanol (25 mM)
12	69	Resposta pressórica direta e indireta de ET-1 em vigência do tratamento alcoólico (25mM)
13	71	Resposta pressórica direta e indireta de NA em vigência do tratamento alcoólico (25mM)

ABSTRACT

The consumption of ethanol can lead to severe liver injury, and can affect the regulation of liver hemodynamics through the release of vasoactive mediators such as nitric oxide and endothelins. The objective of this study was to investigate the effects of ethanol on the changes in arterial and portal perfusion pressures following endothelin receptor activation. Ethanol significantly reduced portal, but not arterial, perfusion pressure, probably through the release of nitric oxide. The endothelin-1-and noradrenaline-induced changes in hepatic arterial and portal inflow resistances were not affected by treatment with ethanol. Endothelins constitute a family of vasoactive peptides that produce potent, long-lasting pressor responses in several vascular beds. Endothelin-1 has been implicated in the regulation of portal blood flow resistance, particularly during cirrhosis and portal hypertension. However, the receptor subtypes induced this phenomenon have not been conclusively identified. The ET_B agonist-induced increase in portal, but not arterial, inflow resistance was significantly reduced in ethanol-perfused preparations. The response was observed following either intra-arterial or intra-portal administration of the agonist. These results suggest that ethanol can diminish the responsiveness of the canine hepatic portal vascular bed to ET_B receptor activation.

RESUMO

O etanol é amplamente consumido podendo conduzir a severos danos *in vivo* e pode afetar a regulação hemodinâmica através da liberação de mediadores de vasoativos como óxido nítrico e endotelinas. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do etanol nas pressões de perfusão arterial e portal induzidas por ativação de receptores de endotelinas. Etanol foi capaz de reduzir significativamente a pressão de perfusão portal, mas não a pressão de perfusão arterial provavelmente pela liberação de óxido nítrico. Endotelina-1 e noradrenalina - (usada como um vasoconstritor independente de receptores de endotelina) induziram mudanças na pressão arterial hepática ou na resistência vascular portal. Tais alterações não foram afetadas pelo tratamento alcoólico. As endotelinas constituem uma família de mediadores de vasoativos, capazes de produzir respostas de pressóricas potentes e de longa duração em vários territórios vasculares. A endotelina-1 está presente na regulação do fluxo portal, particularmente na presença de cirroses e hipertensão de portal. Porém, não foram elucidados os subtipos de receptores que medeiam este fenômeno. Por outro lado, agonistas ET_B utilizados, induziram aumento da pressão portal, mas não arterial e após tratamento da preparação com etanol estas respostas vasculares apresentaram-se significativamente reduzidas. Tais efeitos foram observados tanto quando da administração arterial ou portal dos agonistas ET_B utilizados. Estes resultados sugerem que etanol possa diminuir os efeitos da ativação de receptores ET_B no leito vascular portal de fígado canino.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Anatomofisiologia hepática

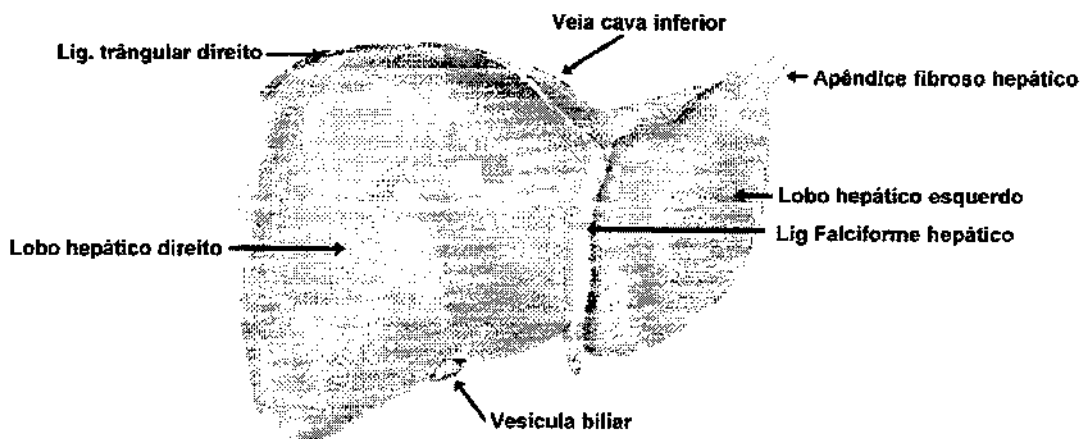
O fígado é a maior glândula do corpo, sendo formado por parênquima e tecido intersticial. Situa-se obliquamente na superfície abdominal do diafragma, mantido nesta posição, em parte, pela pressão exercida pelas outras vísceras abdominais e por sua inserção ao diafragma. Seu parênquima é constituído de lóbulos compostos de células hepáticas poligonais, retículo, canaliculos biliares e sinusóides. Os sinusóides, por sua vez, formam um complexo de grandes capilares drenando em uma veia central.

A função mais aparente do fígado é a secreção de bile, além de ser importante órgão de armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio, sintetizado a partir dos carboidratos absorvidos no intestino delgado intestino e transportados através da veia porta. O fígado também participa da síntese e metabolismo de ácidos graxos e proteínas, desempenhando também papel chave no sistema de depuração de hormônios e de drogas, caracterizando o mecanismo de primeira passagem (GYTON et al, 1985).

O suprimento sanguíneo hepático ocorre através da artéria hepática e da veia porta (SHERLOCK, 1989). Em média 1450 ml de sangue circulam a cada minuto no fígado humano, 1.100 ml de sangue proveniente da veia porta (correspondendo a 75% do fluxo total hepático), fluindo através dos sinusóides hepáticos. Esses se apresentam em íntimo contato com os cordões de células parenquimatosas hepáticas (RUBIN et al, 1991),

drenando nas veias centrais do fígado e seguindo à veia cava. O restante do fluxo sanguíneo hepático total é determinado pelo volume determinado pela artéria hepática. Tais valores correspondem a aproximadamente 29% do débito cardíaco.

Vista anterior da face diafragmática do fígado



Face visceral (inferior)

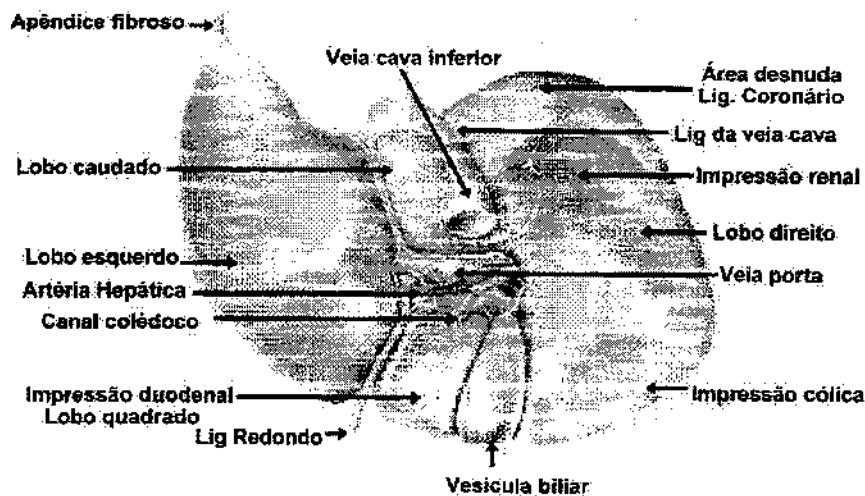


Figura 01 - Anatomia Hepática

Adaptado pelo Autor.

O controle do fluxo sanguíneo hepático proveniente da veia porta é determinado pelo trato gastrointestinal e o baço (SHERLOCK, 1989). Assim sendo, quanto maior a atividade gastrointestinal maior o fluxo hepático. A estimulação dos nervos parassimpáticos do estômago e do cólon, as concentrações de oxigênio no sangue arterial e fatores metabólicos locais também participam desse processo.

A unidade funcional do fígado é o lóbulo hepático (SNELL et al, 1985), estrutura cilíndrica com vários milímetros de comprimento e de 0.8 a 2.0 mm de diâmetro. É constituído em torno de uma veia central, que drena nas veias hepáticas e, posteriormente, na veia cava. O lóbulo hepático é composto por lâminas hepatocelulares que se irradiam do centro para fora da veia central. Cada lâmina hepática tem geralmente a espessura de duas células e, entre as células adjacentes, encontram-se os canalículos biliares (SNELL et al, 1985). Estes se esvaziam nos ductos biliares terminais, que se originam nos septos entre os lóbulos hepáticos adjacentes. No septo, pequenas vênulas recebem o sangue a partir da veia porta. A partir dessa vênulas, o sangue flui para os sinusóides hepáticos, que se situam entre as lâminas hepáticas. Assim, as células hepáticas estão continuamente expostas ao sangue venoso portal. Observa-se também a presença de arteríolas hepáticas, presentes no septo intralobular. Estas irrigam os tecidos do septo e muitas das pequenas arteríolas esvaziam-se diretamente nos sinusóides hepáticos.

Os sinusóides estão revestidos por dois tipos de células: a) as células endoteliais típicas; e b) as células de Kupffer, capazes de fagocitar

bactérias e outros corpos estranhos presentes no sangue. O revestimento endotelial dos sinusóides possui poros extremamente grandes com cerca de 1mm de diâmetro. Abaixo deste revestimento existe um espaço denominado de "Espaço de Disse". Devido a presença de grandes poros no endotélio, as substâncias presente no plasma passam livremente para o Espaço de Disse. As células endoteliais dos sinusóides se assemelham às dos capilares, apresentando entretanto maior permeabilidade. A pressão sinusoidal não ultrapassa os 8 mmHg, de maneira que a maioria das proteínas que saem do seu interior pelo processo de difusão, retornam pelo mesmo processo. Isso faz com que o sangue circulando pelo fígado tenha um contato íntimo com células do parênquima hepático, facilitando a permuta rápida de nutrientes.

Outra função do fígado é a de servir como reservatório (RUBIN, et al,1991). Por ser um órgão distensível e compressível, grandes quantidades de sangue podem ser armazenadas em seus vasos sangüíneos. Na espécie humana o fígado armazena em média cerca de 500 ml de sangue nas veias e sinusóides hepáticos. Entretanto, ocorrendo aumento da pressão atrial direita (pressão retrógrada), o fígado pode reter até o dobro se sua capacidade normal de armazenamento. Este fato ocorre principalmente na insuficiência cardíaca direita com congestão periférica. Por outro lado, o fígado também é capaz de fornecer sangue extra na presença de hipovolemia.

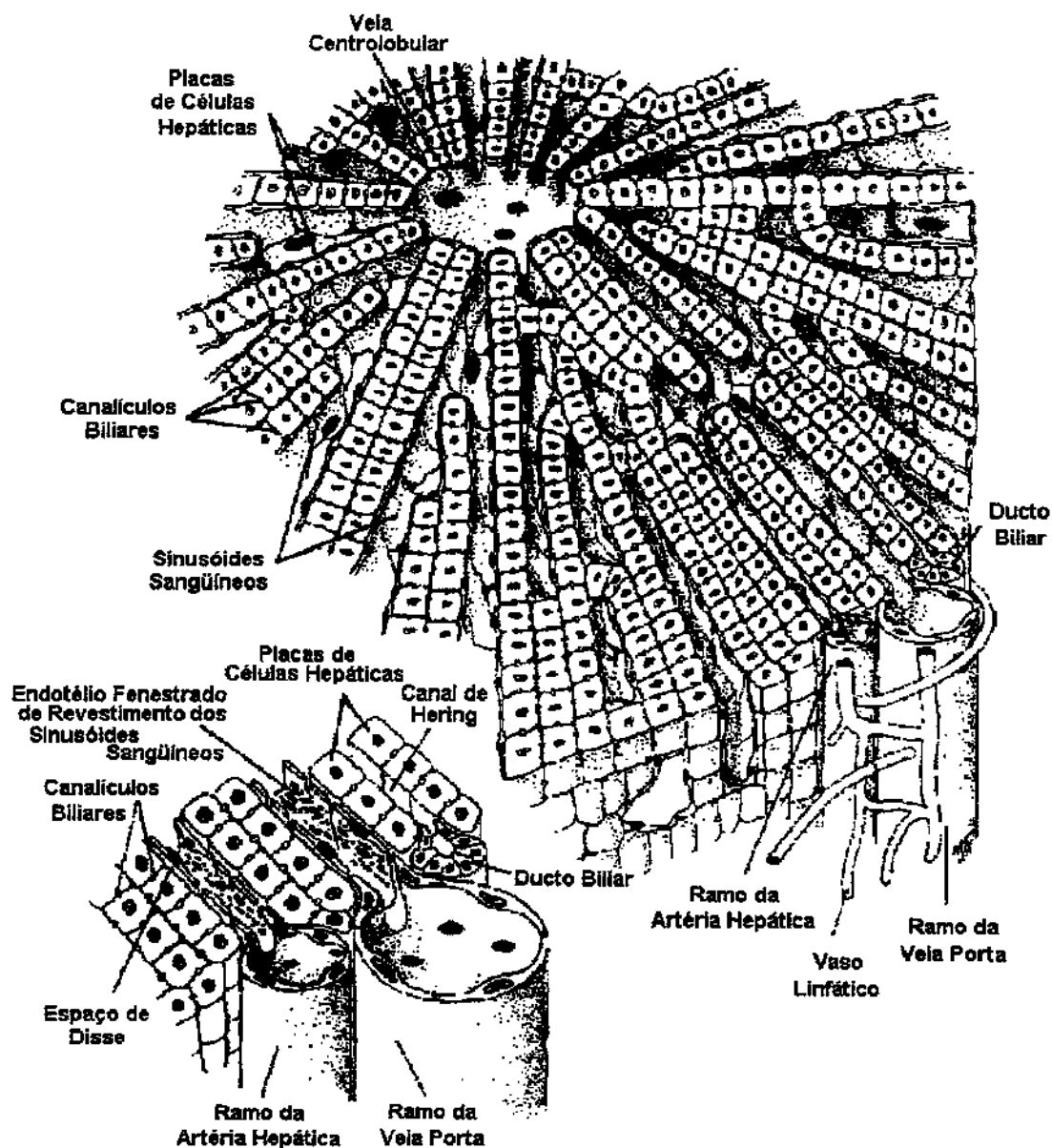


Figura 02. Parte de um lóbulo hepático: abaixo observa-se em maior aumento a triade portal. Para maior clareza, as células de Kupfer foram omitidas (Snell,1985)

O estudo experimental da microcirculação hepática depende da utilização de modelos animais que apresentem semelhanças anatômicas e funcionais ao fígado humano. Seguindo esse raciocínio, várias espécies têm sido utilizadas, incluindo porcos, cães, coelhos e ratos (KRAUS *et al*, 1995, ,

WITHRINGTON *et al* ,1989; HARTLEB *et al*, 1994; OSHITA *et al* , 1994). A utilização de fígado porcino é amplamente aceita, sendo inclusive o modelo de preferência para a realização de transplantes experimentais. Entretanto, sua utilização implica em recursos obrigatórios para manutenção desses animais, incluindo biotério e outros. O uso de ratos e coelhos é adotado em vários laboratórios devido à facilidade e custos de manutenção. Entretanto, a perfusão *in vitro* de fígado de ratos tem suas limitações, principalmente relacionadas a impossibilidade de perfusão da artéria hepática dado seu pequeno calibre. Por outro lado, o modelo de perfusão de fígado canino sem mostra útil, uma vez que se assemelha ao fígado humano, tem custos menores de manutenção e permite a canulação da artéria hepática em sistemas de perfusão.

1.2 - Anatomia hepática canina

O fígado canino é relativamente volumoso, pesando normalmente cerca de 3 por cento do peso corporal. Divide-se em cinco lobos principais por fissuras que convergem na fissura portal. O lobo lateral esquerdo é o maior e seu contorno é oval; o lobo medial esquerdo é menor e de forma prismática; o lobo medial direito é o segundo em tamanho, apresentando o lobo quadrado onde se situa a vesícula biliar. O lobo lateral direito é o terceiro em tamanho e tem contorno oval. Apresenta o lobo caudado em sua face visceral composto à direita pelo processo caudado e pelo processo papilar à esquerda. Ambos muitas vezes são subdivididos por fissuras secundárias (SISSON/GROSSMAN, 1984).

A face diafragmática (parietal) é fortemente convexa em conformidade com a curvatura do diafragma e a parte adjacente da parede ventral do abdome com a qual está em contato. A face visceral é em geral côncava, sendo irregular por adaptar-se as vísceras que estão em contato. A artéria hepática penetra no fígado na parte dorsal da fissura, a veia porta penetra centralmente, e o ducto hepático emerge na parte ventral. A borda dorsal apresenta uma profunda impressão renal em sua parte direita. A veia cava caudal passa ventral e cranialmente, a princípio em um sulco profundo no lobo caudado, depois em grande parte incluída na face diafragmática do lobo lateral direito; ela recebe duas ou três veias hepáticas volumosas antes de perfurar o diafragma.

1.3 - Farmacologia do álcool etílico (etanol)

1.3.1 - Características e metabolização do etanol

O etanol é uma molécula orgânica simples, produzida a partir da fermentação de microrganismos, tendo com substratos açúcar, água, oxigênio sob equilíbrio ácido-básico. Este é totalmente absorvido no estômago (~20%) e porção superior do intestino delgado (~80%). Após sua absorção, o etanol penetra a circulação sistêmica, distribuindo-se pela massa corpórea (cérebro, músculos, fígado, etc.). O etanol é imediatamente distribuído em todos os compartimentos aquosos do organismo. Suas concentrações nas determinadas áreas dependem em parte das diferenças de concentrações regionais de água, uma vez que não há membranas impermeáveis a sua passagem. Assim sendo, sua concentração sanguínea reflete a de todo o organismo. O etanol também se difunde sem resistência

pela barreira hematoencefálica e placentária, atingindo assim no feto os mesmos níveis observados na mãe.

Acima de 90% do etanol é metabolizado no fígado e pequena fração é eliminada inalterada pelos pulmões e rins. Essa fração, no entanto, pode elevar-se após seu consumo excessivo. A metabolização hepática é realizada por três vias:

Álcool desidrogenase

Oxidação do etanol para acetaldeído através do ADH hepático é o principal caminho responsável pelo metabolismo do álcool (CRABB *et al*, 1987). Além da oxidação de etanol, uma variedade larga de álcoois primários, secundários e aromáticos servem também como substrato para esta enzima. Esta enzima também pode representar um papel na desidrogenação de esteróides e oxidação de ácidos graxos (LIEBER *et al*, 1984). Existem em torno de 20 isoenzimas diferentes de ADH que são codificadas por sete genes diferentes. Embora ADH esteja presente em outros órgãos, a maior atividade é achada em fígado (CRABB *et al*, 1987). A atividade da ADH gástrica é aparentemente baixa em fêmeas, em alcoólatras e em pacientes submetidos a gastrectomias (FREZZA *et al* , 1990 e CABALLENA *et al*, 1991). A dose de álcool capaz de promover o desenvolvimento da cirrose hepática é, em média menor em mulheres (20g/dia), do que a observada em homens (40-60g/dia) (PEQUIGNOT *et al*, 1978). Diferenças no metabolismo do álcool em relação ao sexo têm sido descritas tanto para o metabolismo hepático, quanto para o gástrico (ARTHUR JM *et al*, 1984; COLE-HARDING & WILSON, 1987; MISHA *et al*,

1989). A administração de drogas tais quais cimetidina, ranitidina, nizatidina, e aspirina podem abaixar a atividade de ADH gástrica (FREZZA *et al* , 1990, CABALLENA *et al*, 1991, DIPADOVA *et al*, 1992 e ROME *et al*, 1990), e isto tem importante significado clínico no que diz respeito a toxicidade do álcool.

É bem conhecido que os indivíduos variam na eliminação do etanol e na suscetibilidade para alcoolismo e suas complicações associadas (BOSRON *et al*, 1988). Enquanto ADH parece ser o caminho principal de oxidação do etanol (CRABB *et al*, 1987) sob condições normais, há a incerteza sobre seu significado na oxidação em consumo crônico e baixas concentrações de etanol. Alcoólatras crônicos toleram quantias maiores de álcool, e esta tolerância metabólica é associada com taxas aumentadas de liberação de etanol sangüíneo (LIEBER *et al*, 1984).

A ação da enzima álcool-desidrogenase (ADH) sobre o etanol utiliza o nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) como receptor de hidrogênio, produzindo o nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido (NADH). Forma-se assim o acetaldeído, produto tóxico do etanol, responsável por alguns de seus efeitos, como rubor e a perda de calor devidos à vasodilatação dos capilares cutâneos. Uma vez formado, o acetaldeído é oxidado pela ação da aldeído desidrogenase, também com a conversão de NAD em NADH, gerando H₂O, CO₂ e acetato ou acetil-coenzima-A, podendo esta última ser oxidada através do ciclo do ácido cítrico, ou participar de outras vias metabólicas, como a síntese de ácidos graxos e colesterol. A regeneração do NAD limita a velocidade de metabolização do etanol pelo ADH. O

aumento do nível metabólico pode estar relacionado com a elevação da regeneração do NAD.



Figura 03 - Mecanismo de metabolização hepática do álcool.

Sistema de oxidação microssomal

O sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS) (LIEBER *et al*, 1984) parece ser responsável pelo metabolismo do álcool sob ingestão crônica ou quando se estabelece altos níveis de etanol sanguíneo. O MEOS se refere coletivamente ao citocromo P-450 específico (LIEBER *et al*, 1990) que é induzido pelo álcool. Este sistema adquire importância crescente com o consumo crônico de elevadas quantidades de etanol. Nesses casos, observa-se uma hipertrofia do retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos (LIEBER *et al*, 1990), o que explica o elevado índice de oxidação de drogas como antibióticos, tranquilizantes e sedativos, bem como o risco de toxicidade quando usados concomitantemente com o etanol.

O MEOS catalisa a oxidação do etanol na presença de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), resultando na geração de acetaldeído, NADP, e água. Ao mesmo tempo que o aumento no MEOS com ingestão de etanol crônica pode ser adaptável, pode haver efeitos adversos e sérios ao fígado. As induções do citocromo P-450 devido ao etanol podem explicar a vulnerabilidade aumentada de alcoólatras aos solventes industriais como tetracloreto de carbono (LIEBER *et al*, 1990) e para analgésicos como acetaminofem (MADDREY *et al*, 1987). A ativação induzida do MEOS através do etanol também pode explicar a suscetibilidade aumentada de alcoólatras ao câncer pela ativação de carcinógenos (LIEBER *et al*, 1990). Finalmente, a indução do sistema microsomal pelo álcool associada à produção aumentada de acetaldeído pode afetar a funcionalidade dos hepatócitos (LIEBER *et al*, 1990).

Sistema de catalase binária associada aos peroxissomos

Um caminho diferente para oxidação do etanol envolve a catalase peroxissomal. O etanol, em presença de peróxido de hidrogênio, é convertido a acetaldeído com a formação de água. Este processo contribui muito pouco no metabolismo do álcool (HANDLER *et al*, 1990). Por outro lado, tem sido sugerido que catalases possam representar um papel significativo na oxidação do etanol em ratos ADH-deficientes (NORSTEN *et al*, 1989).

1.3.2 - Ações do etanol sobre o SNC e sistemas de neurotransmissão

O álcool é um depressor do SNC. Apesar de ser consumido especialmente pela sua ação estimulante, esta é aparente e ocorre com

doses moderadas, resultando da depressão de mecanismos controladores inibitórios. Esses efeitos sobre o SNC são proporcionais a alcoolemia.

A - Membrana Neuronal

Doses subletais de etanol não suficientes para provocar mudanças importantes na membrana neuronal. Entretanto doses mais elevadas podem promover anestesia geral, através da elevação na permeabilidade da membrana aos íons responsáveis pela diferença eletroquímica entre os meio extra e intracelulares, semelhante ao que ocorre com anestésicos gerais.

B - Ações sobre o sistema GABA

As vias neuronais que utilizam o ácido gamaaminobutírico (GABA) desempenham importante ação inibitória sobre as demais vias nervosas. Sua ativação, promove, entre outros efeitos, elevação do limiar convulsivo, devido a uma inibição generalizada do encéfalo; além de hipnoindução, relaxamento muscular, e incoordenação motora decorrente da inibição cerebelar. O receptor para GABA encontra-se associado a canais de cloro e a receptores benzodiazepínicos, formando um complexo funcional. Quando do acoplamento agonista-receptor, propicia aumento da abertura destes canais permitindo a passagem de íons para o meio intracelular causando hiperpolarização neuronal, levando o neurônio a requerer um potencial de ação mais elevado para despolarização. Concentrações de etanol entre 10 e 50 mM potenciam o fluxo de cloro mediado pelos receptores de GABA em diversas áreas cerebrais. Porém, baixas concentrações de etanol promovem a facilitação da inibição GABAérgica no córtex cerebral e na medula cerebral.

C - Ações sobre os canais de íons cálcio

O influxo de íons cálcio para o interior das células desempenha importante papel na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, como também na atividade de segundo mensageiro celular. Em concentrações de 25 mM o etanol inibe a passagem de cálcio através dos canais iônicos, diminuindo a liberação de neurotransmissores. Quando retirado o etanol, esses canais iônicos estariam hiperatuantes, promovendo um incremento no fluxo de cálcio e causando um acréscimo na neurotransmissão.

1.4 - Endotelina

O endotélio participa na hemostasia, particularmente na regulação do tônus vascular (FURCHGOTT, 1983; GRYGLEWSKI *et al.*, 1988). A descoberta da prostaciclina (PGI_2 , MONCADA *et al.*, 1976) e do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980), posteriormente identificado como óxido nítrico (NO; PALMER *et al.*, 1987), provocou grande interesse no estudo do endotélio como mediador das respostas vasculares. YANAGISAWA *et al.* (1988) demonstraram que além destas substâncias vasodilatadoras, o endotélio produz também um importante agente vasoconstritor, a endotelina (ET). Esta foi observada primeiramente em estudos experimentais do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF/NO) em que células do sobrenadante de aorta bovina produzia pequena vasoconstrição e de longa duração em coronária porcina ao invés do efeito relaxante esperado. Essa contração não foi atribuída a nenhum mediador vasoconstritor até então conhecido, mas sim a uma

substância de origem peptídica (HICKEY *et al* , 1985 e O'BRIEN *et al* , 1987). Em 1988, YANAGISAWA *et al* purificaram e identificaram este agente, isolada de sobrenadante de cultura de células endoteliais de aorta de porco.

A endotelina-1 consiste de um peptídeo com 21 aminoácidos. Quando injetado por via endovenosa induz resposta pressora de longa duração (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Contém duas pontes de dissulfeto que ligam em pares os resíduos de cisteína. Esta estrutura molecular não é comum em mamíferos, é porém encontrada em grupos determinados de toxinas que atuam em canais de membranas tais quais, aparina, cronotoxina e as neurotoxinas de venenos de escorpião. TAKASAKI *et al.* (1988 e 1991) demonstraram posteriormente a semelhança entre a seqüência de aminoácidos das toxinas da *Atractapis engandensis* com a seqüência de aminoácidos das endotelinas. Tais toxinas denominadas por sarafotoxinas S6, contém 21 aminoácidos dos quais 14 se sobrepõem exatamente a seqüência de resíduos de ET-1 (INOUE *et al.*, 1989).

Análises de genomas humanos de endotelina (ET) demonstraram a existência de três genes distintos de ET. A seqüência destes três genes humanos é altamente conservada nas regiões dos 21 resíduos de aminoácidos. A ET inicialmente isolada de cultura de células endoteliais porcinas foi denominada de ET-1. As outras duas foram designadas de ET-2 e ET-3 (INOUE *et al.*, 1989). Uma nova seqüência de peptídeos foi descoberta por clonagem (SAIDA *et al* , 1989) e denominada de substância contrátil intestinal (VIC) ou endotelina- β . Este é descrito como ET-2, pois o

RNA_m que codifica este precursor é do mesmo tamanho do que codifica a ET-2 e diferenciando bastante dos que codificam as ET-1 e ET-3 (BLOCK *et al*, 1991).

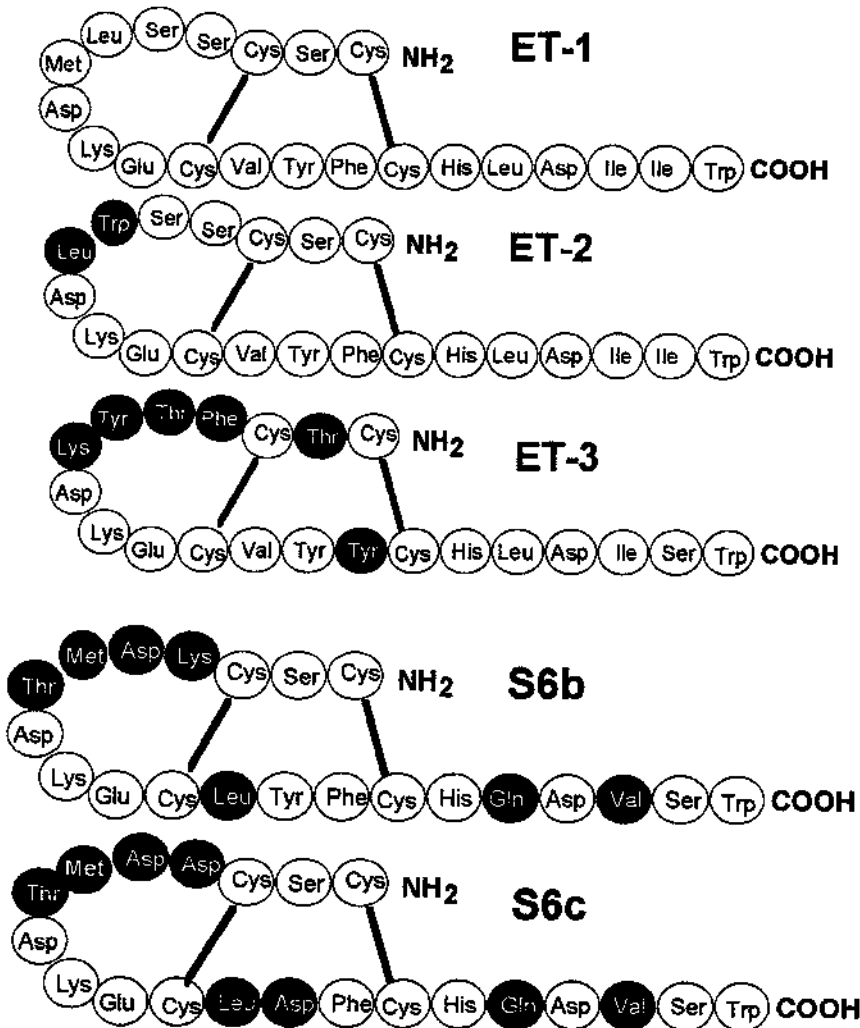


Figura 04. Sequência de aminoácidos das ET-1, ET-2, ET-3, S6b e S6c mostrando as ligações dissulfeto e os resíduos que diferem entre si (círculos cheios). Fonte: HUGGINS *et al.*, 1993 - Adaptado pelo Autor.

A ET-1 é formada a partir de um precursor que contém 203 resíduos de aminoácidos denominado de preproendotelina (ppET-1), o qual é clivado por uma endopeptidase (específicas para aminoácidos básicos pareados) entre os resíduos de Arg-Arg e Lis-Arg (posição 92-93 da ppET-1 porcina e

91-92 da ppET-1 humana respectivamente). Com a clivagem desta proteína origina-se a pró-endotelina ou "big endotelina", produto intermediário contendo 39 resíduos de aminoácidos em porcos e 38 em humanos (YANAGISAWA *et al* , 1988). A ET-1 origina-se de uma clivagem proteolítica entre os resíduos de Trp[21] e Val[22] da pró-endotelina pela enzima conversora de endotelina (ECE). A pró-ET-1 e a ET-1 são equivalentes em aumentar a pressão arterial *in vivo*. Entretanto, a pró-ET-1 possui apenas 1% da potência pressórica da ET-1 no tocante ao efeito contrátil em segmentos vasculares *in vitro* (KIMURA *et al* , 1989); com isto, prova-se que a pró-ET-1 é rapidamente convertida em ET-1 *in vivo*, pela ação da ECE (D'ORLEANS-JUSTE *et al* , 1990).

Até então já foram clonadas duas ECEs sendo a primeira (ECE-1 XU *et al* , 1994; SHIMADA *et al* , 1994) responsável pela conversão de pró-ET-1 em ET-1 a nível de membrana celular e a segunda (ECE-2, EMOTO *et al* , 1995) responsável pela conversão a nível intracelular, esclarecendo a diferença de potência das respostas da pró-ET-1 e ET-1 *in vivo* e *in vitro*.

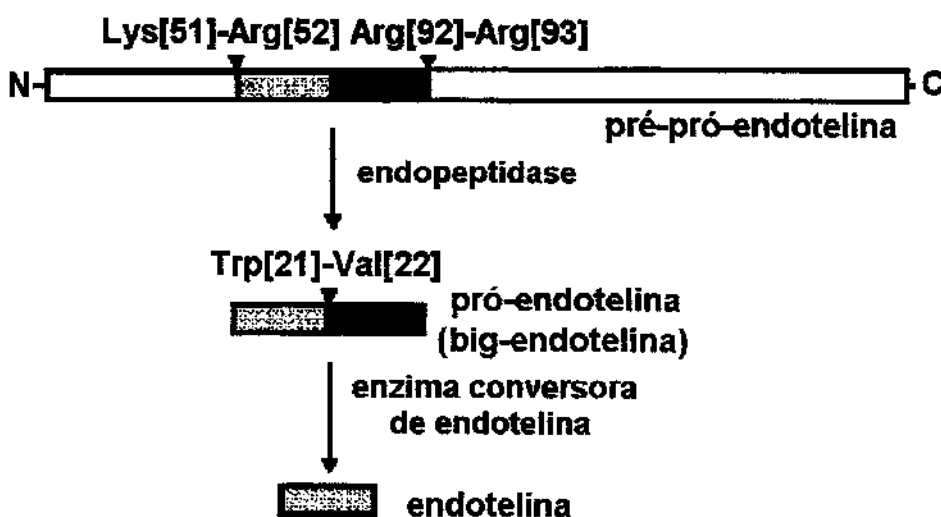


Figura 05. Biossíntese da ET-1. A sequência da endotelina está ilustrada na porção cinza claro. A endopeptidase específica para o par de aminoácidos dibásicos a "big endotelina", um precursor da endotelina que provém da ppET. A enzima conversora de endotelina cliva a ligação entre Trp21 - Val22 liberando a ET-1.

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

Em indivíduos sadios, os níveis de ET-1 estão na faixa de pg/ml, tornando-se aumentados em condições patológicas tais como infarto do miocárdio (STEWART *et al.*, 1991a) e pré-eclâmpsia (TAYLOR *et al.*, 1990).

Como já mencionado, a endotelina, promove um efeito vasoconstritor, mediado através de dois sistemas de transdução distintos: a ativação de canais de cálcio (YANAGISAWA *et al.*, 1988; GOTO *et al.*, 1989; KASUYA *et al.*, 1989) e/ou ativação de fosfolipase C (ABDAEL-LAFIT & ZHANG, 1991; HU *et al.*, 1990), os quais estão intimamente ligados a proteína G. Seu efeito vasodilatador é devido à liberação de prostanóides (prostaciclina [PGI₂] e prostaglandina E₂ [PGE₂]) e EDRF/NO, motivo pelo qual se acredita que tais efeitos vasoconstritores evocados pela ET-1 tanto *in vivo*, como em determinados leitos vasculares *in vitro*, tais como mesentério de rato (WARNER *et al.*, 1989a), baço e rins de coelho (RAE *et al.*, 1989) e fígado de cão *in situ* (WITHRINGTON *et al.*, 1989), sejam modulados pela liberação acoplada de EDRF/NO, PGI₂ PGE₂, que limitam a amplitude e a duração destas respostas.

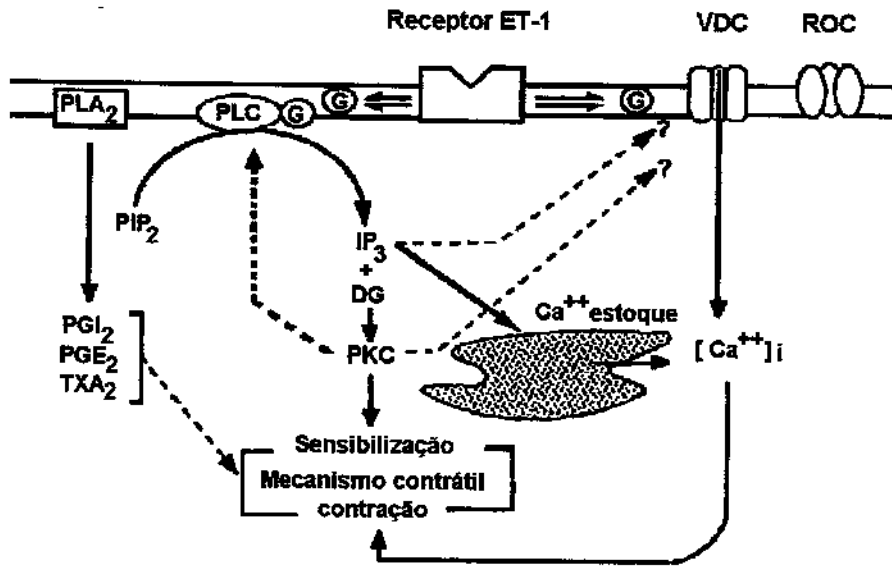


Figura 06 - Vias de transdução de sinais intracelulares ativados pelas endotelinas (ETs). O receptor de ET ativado estimula a fosfolipase C (PLC) e a fosfolipase A2 (PLA₂). O receptor de ET ativado também estimula canais de cálcio dependente de voltagem (VDC) e, provavelmente, canais de cálcio operados 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

Os diferentes efeitos farmacológicos das endotelinas indicam a existência de diferentes tipos de receptores para as mesmas, os quais estão distribuídos nos vários tecidos em diferentes quantidades. Atualmente, existem descritos dois tipos de receptores: ET_A (ARAI et al., 1990) e ET_B (TAKAI et al., 1992). Um terceiro tipo de receptor de ET-1 (ET_C) foi relatado

(KLOOG *et al.*, 1989 EMORI *et al.*, 1990; e HARRISON *et al.*, 1992), porém nenhum agonista ou antagonista seletivo para este receptor foi descrito.

O efeito vasoconstritor induzido pela ET-1 *in vivo* (DE NUCCI *et al.*, 1988a) e *in vitro* em leitos microvasculares como mesentério (WARNER *et al.*, 1989), fígado de cão (WITHRINGTON *et al.*, 1989), rim e baço de coelhos (RAE *et al.*, 1989) deve-se a ativação de receptores ET_A (ARAI *et al.*, 1990). No entanto, o efeito vasoconstritor é ocasionalmente precedido por uma breve fase vasodilatadora decorrente da liberação de óxido nítrico (NO), PGI₂ e prostaglandina E₂ pelas células endoteliais como consequência da ativação dos receptores ET_B (SAKURAI *et al.*, 1992). Atualmente sabe-se que a atividade vasoconstritora da ET-1 é mediada pela ativação tanto dos receptores ET_A como dos ET_B (SUMNER *et al.*, 1992; OKAMURA *et al.*, 1992; MORELAND *et al.*, 1992; GODFRAIND, 1993; WARNER *et al.*, 1993, GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1995), ao passo que o efeito vasodilatador parece ser supostamente mediado pela ativação de receptores ET_B (CLOZEL *et al.*, 1992). WARNER *et al.* (1993 a,b) demonstrou mais recentemente as múltiplas funções dos receptores ET_B que estão presentes no sistema cardiovascular de mamíferos: ET_{B1} causando vasodilatação em mesentério de ratos e o ET_{B2} causando contração em "strip" de estômago de ratos e vasoconstrição em artéria pulmonar de ratos (OLHSTEIN *et al.* 1994a). O receptor ET_A também está relacionado com a liberação de prostanóides em fígado isolado de ratos (WARNER *et al.*, 1993).

Em muitos tecidos vasculares o endotélio exerce um papel fundamental na manutenção da integridade da microcirculação (HYSLOP &

DE NUCCI, 1992, 1993, FORTES *et al.*, 1994). A circulação esplênica, por exemplo, é muito sensível às propriedades vasoconstritoras da ET-1 (WITHRINGTON *et al.*, 1992) que, por sua vez, provoca a liberação concomitante de prostanóides como a PGE_2 e PGI_2 , que modulam a amplitude e duração da resposta vascular à ET-1 (GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1994 a,b). Deste modo, é obtido um equilíbrio no qual os fatores derivados do endotélio controlam o tônus do músculo liso vascular. Distúrbios deste equilíbrio, através do dano endotelial, podem apresentar implicações substanciais para a integridade funcional da microcirculação. Entretanto, pouco é conhecido sobre o papel do endotélio no controle da circulação hepática, embora já tenha sido demonstrado anteriormente que a ET-1 é um potente agente vasoconstritor da artéria hepática e da veia porta (WITHRINGTON *et al.*, 1989).

Na microcirculação hepática estudos e o papel dos receptores de endotelina neste sistema são pouco conhecidos. Na atualidade, sabe-se que as células endoteliais sinusoidais hepáticas são capazes de produzir endotelina-1 quando estimuladas com TGF_β (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; YANG *et al.*, 1990; SERRADEIL LE GAL *et al.*, 1991; THAN THI *et al.*, 1993), sendo que esta desaparece com dose seguidas deste agonista, isso não ocorre com a vasoconstrição portal, sugerindo a presença de mais de um tipo de receptor neste leito vascular em particular.

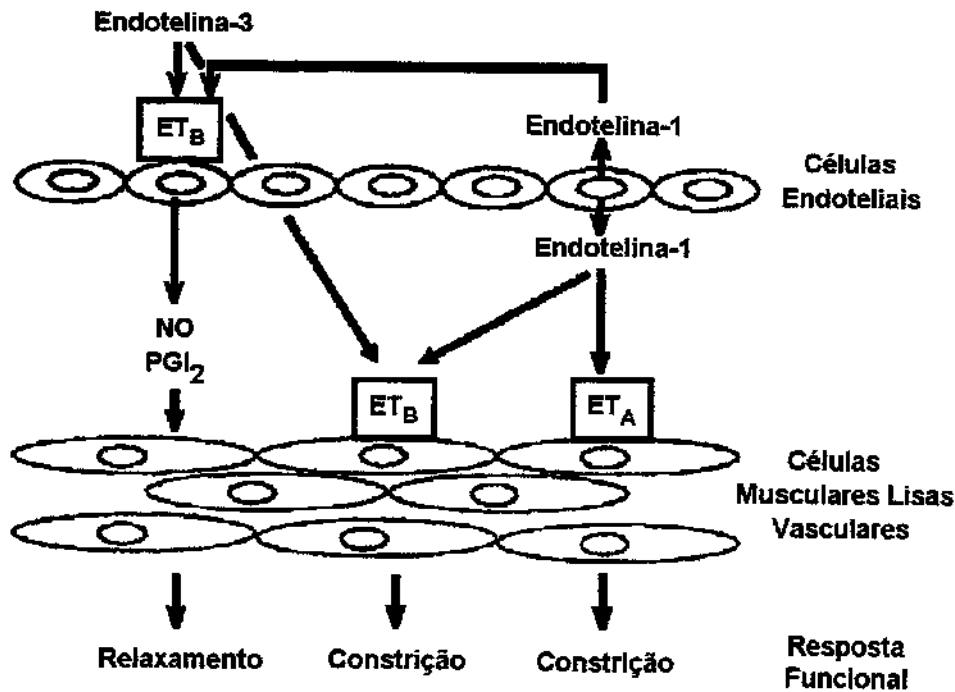


Figura 07. Mecanismo de ação da endotelina. Fonte: DAVENPORT & MAGUIRE, 1994. Traduzido pelo autor.

Em fígado isolado e perfundido de cão, existe um predomínio de receptores ET_A no leito arterial. As respostas produzidas pela ativação desses receptores é modulada por NO, confirmado pela potenciação das respostas vasoconstritoras evocadas por agonistas ($ET-1$ e Sarafotoxina-6b) em presença de L-NAME, e prostaciclina, em presença de indometacina, tal qual, pela dosagem de 6-oxo $PGF_{1\alpha}$ (produto da degradação da prostaciclina), em efluente hepático (FARO et al., 1995). ROCKEY & WEISIGER, 1996, observaram que em perfusão de fígados cirróticos de ratos predominavam os receptores do tipo ET_B .

1.5 - Óxido nítrico

O endotélio tem a capacidade de sintetizar dois potentes vasodilatadores e, ao mesmo tempo, inibidores da função plaquetária: a PGI_2 (MONCADA *et al*, 1976) e o EDRF (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Ambas as substâncias são liberadas de maneira simultânea e acoplada em resposta a um estímulo (DE NUCCI *et al*, 1988a). FURCHGOTT & ZAWADZKI em 1980, investigando os efeitos da acetilcolina em vasos isolados, observaram que o relaxamento produzido por este agonista depende da presença de endotélio. A acetilcolina, ao ativar os receptores muscarínicos localizados nas células endoteliais, promove a liberação de uma substância que difunde-se para a musculatura lisa adjacente, causando o relaxamento do vaso. Mais adiante, observou-se que tal substância, o EDRF, era liberada também em resposta a outros mediadores tais como histamina, noradrenalina, bradicinina, serotonina, trombina, angiotensina, entre outras (GRYGLEWSKI *et al*, 1988).

O reconhecimento do EDRF como NO foi baseado no fato de que, em tecidos vasculares, a atividade dos dois são similares (PALMER *et al*, 1987 e IGNARRO *et al*, 1987), como também, as respostas a ambos compostos são potenciadas pela enzima superóxido dismutase (GRYGLEWSKI *et al*, 1986) e abolidas pela hemoglobina e pelo azul de metileno (GRUTTER *et al*, 1981; MARTIN *et al*, 1985b). Ambos induzem efeitos relaxantes na musculatura lisa vascular através da estimulação da guanilato ciclase solúvel, levando a um acúmulo de monofosfato de guanosina (GMP_c ; HOLZMANN, 1982; Rappoport & Murad, 1983) e a diferenciações de vários processos celulares

dependente de GMP_c (LINCOLN & CORNWELL, 1991 e 1993). Promovem também inibição da agregação plaquetária e principalmente a adesão destas (RADOMSKI *et al* , 1987a,b; SNEDDON & VANE, 1988), possuindo meia vida semelhante e estabilidade em soluções ácidas (MURRY *et al*, 1986).

O óxido nítrico é sintetizado pelas células endoteliais a partir do nitrogênio guanido terminal do aminoácido L-arginina (PALMER *et al*, 1988a,b; SCHMIDT *et al*, 1988), sendo a L-citrulina o co-produto desta reação. As enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico (óxido nítrico sintases - NOS) são dependentes de nicotidamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e são classificadas em 3 tipos essenciais: duas constitutivas, sendo elas endotelial e neuronal , dependentes de cálcio e calmodulina (BREDET & SNYDER,1990 e FORSTERMANN *et al*.,1993, respectivamente) e uma induzível, cálcio-independente (MARLETTA *et al*., 1989)

Por ser um gás hidrofóbico, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde se combina com moléculas específicas. Dentre estas, encontra-se o ferro na forma reduzida (Fe^{2+}), contido em determinadas proteínas como exemplo, a guanilato ciclase. Esta ligação, NO/grupamento heme da guanilato ciclase, causa aumento drástico e rápido da sua atividade catalítica, o que resulta em aumento de até 200 vezes na velocidade de formação de GMP_c , alterando vários processos intracelulares como, a ativação de canais de potássio via proteínas quinase dependentes de GMP_c . O NO exógeno, tal qual o EDRF nativo, são capazes de ativar diretamente canais de potássio dependentes de cálcio por um mecanismo independente de GMP_c (BOLOTINA *et al*., 1994).

A hemoglobina contida nos eritrócitos é outra molécula que contém o ferro na sua forma reduzida. Conseqüentemente, no momento em que o NO difunde-se da célula endotelial para o leito vascular, o mesmo é rapidamente captado pelos eritrócitos. A reação com a hemoglobina, tal qual com oxiemoglobina, origina os nitratos (NO_3^-), os quais serão finalmente eliminados por filtração glomerular. Os nitritos (NO_2^-) também constituem produto da degradação do NO, porém, são convertidos rapidamente em nitratos, pela reação oxidativa a qual pode ser realizada pela própria oxihemoglobina. Compostos estruturalmente análogos a L-arginina inibem a NOS. Inicialmente observou-se que a N^G -monometil L-arginina (L-NMMA) tinha a capacidade de inibir a síntese de NO e que este efeito caracterizava-se pelo fato de ser dependente da dose e específico para a forma levógira (PALMER *et al*, 1988; REES *et al*, 1989). Mais tarde outros inibidores foram sintetizados, destacando-se a N^G -nitro-L-arginina (L-NNA), o N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, MOORE *et al*, 1990) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO, MULSCH & BUSSE, 1990).

A NO constitutiva encontra-se sob a forma inativa até que a calmodulina, estimulada pelo cálcio, liga-se a essa enzima, ativando-a e determinando a liberação contínua de pequenas quantidades de NO. A NOS constitutivas subdividem-se em neuronal e endotelial, a primeira de peso molecular 168 kDa e a segunda 135 kDa. A NOS neuronal é oriunda de neurônios nitrérgicos e a endotelial regula o tônus vascular bem como a adesão e agregação de plaquetas. De modo inverso, a forma induzível não é comumente encontrada, entretanto à partir de determinados estímulos, tais

como citoninas (interleucina-1, fator de necrose tumoral [TNF] e interferon- γ) e lipopolissacarídeos. Tanto células endoteliais, bem como musculares lisas, macrófagos, hepatócitos, miócitos dentre outras, são capazes de expressar uma forma induzível da NOS, expressão esta, que é inibida pelos glicocorticóides (Moncada *et al.*, 1991). A NOS induzível, quando expressa, independe do complexo cálcio-calmodulina, liberando grandes quantidades de NO por períodos relativamente prolongados.

Acredita-se que a NOS constitutiva esteja relacionada à modulação de parâmetros fisiológicos e por outro lado, a NOS induzível estaria mais relacionada aos processos patológicos (PETROS *et al.*, 1994). Neste sentido, agentes que inibissem seletivamente as diferentes isoformas de NOS poderiam ser de grande valor terapêutico. Na atualidade, algumas isotiurêias, compostos não análogos à L-arginina, têm sido descritas como inibidores mais seletivos da NOS induzível (SOUTHAN *et al.*, 1995).

1.6 - Prostaciclina

A síntese da prostaciclina ocorre a partir de ácidos graxos essenciais (provenientes da dieta) que se transformam em fosfolipídeos por esterificação na membrana. Estes, por ação da fosfolipase A₂, dão origem ao ácido araquidônico, responsável pela origem de duas famílias de autacóides: uma formada pelas prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ e PGF_{2 α}), prostaciclina e tromboxano, e outra formada pelos leucotrienos. A PGI₂ é quimicamente instável com meia vida de 2 a 3 minutos e é convertida em 6-ceto PGF_{1 α} .

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) *Hipotensão.* 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) *Broncodilatação*. Ocorre na maioria das espécies estudadas. Além disso, a prostaciclina antagoniza a broncoconstrição induzida por outros agentes;

d) *Relaxamento de útero humano grávido*;

e) *Vasodilatação*. 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 para a maior parte dos ácidos graxos.

2 - OBJETIVOS

Investigar os efeitos da perfusão de etanol sobre as respostas vasculares hepáticas mediadas por agonistas de receptores de endotelina

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Hepatectomia/Perfusão

Hepatectomia foi efetuada em cães (8.27 ± 0.47 kg) sem raça definida, de ambos sexos, sob anestesia geral com pentobarbital sódico (Sagatal[®]; 30 mg/Kg, i.v.), e ventilação mecânica. Foram isoladas a veia cava inferior supradiafragmática e abdominal, artéria hepática e veia porta. Administrou-se heparina por via venosa (5000 UI/cão) para prevenção de formação de trombos hepáticos.

Em bancada foram canuladas a artéria hepática, veia porta e veia cava supradiafragmática. As cânulas da veia porta e artéria hepática foram conectadas ao sistema de perfusão com 2 circuitos (arterial e portal), com fluxo determinado através de bombas peristálticas, com solução tampão Krebs aerado (95% O₂ + 5% CO₂, pH 7,4) e sob temperatura constante de 37°C. A solução de Krebs teve a composição em mM: NaCl 118, NaHCO₃ 25; KCl 4.7; KH₂PO₄.7H₂O 1.17; CaCl₂.6H₂O 2.5 e C₆H₁₂O₆ 5.6. Ao circuito arterial foi incorporado um transdutor de pressão (GEMINI- modelo 7070) para a medida da variação da pressão de perfusão da arterial hepática (HAPP), e ao circuito venoso, um medidor de pressão venosa (UGO SACHS -ELEKTRONIK, modelo W101), para medida da variação da pressão de perfusão vascular portal (PVPP). Ambos transdutores foram conectados a um registrador de dois canais (Ugo Basile). As pressões foram registradas continuamente durante os experimentos e as respostas máximas à veiculação de substâncias teste foram

calculadas em função da razão fluxo/pressão e expressas sob forma de resistência (mmHg.ml.min^{-1}). O fluxo das bombas peristálticas foi ajustado e mantido constante de modo a obter uma pressão média aproximada de 20 - 40 mmHg para artéria hepática e 2- 4 mmHg para veia porta. Os diferentes experimentos foram iniciados após tempo de estabilização aproximadamente de 30 - 60 min sob perfusão.

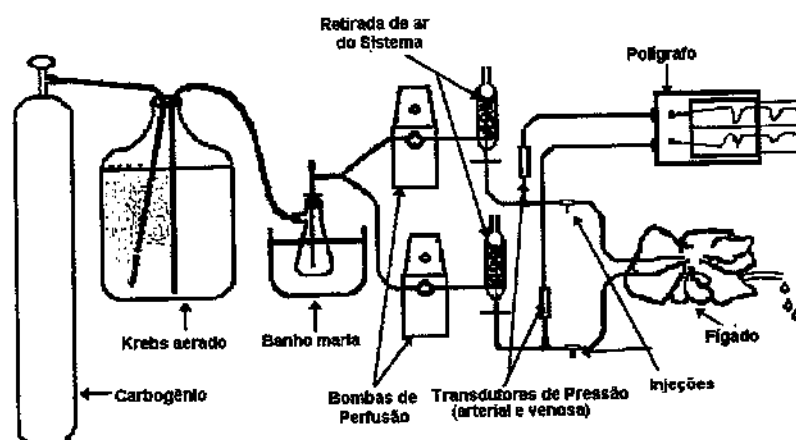


Figura 08- Sistema de perfusão de fígado isolado

3.2 - Efeitos do etanol

Os efeitos do etanol nas pressões de perfusão da veia porta e artéria hepática foram investigados através de protocolos experimentais com concentração e tempo diferentes, isto é, perfundiu-se em ambos leitos etanol a uma concentração de 100 mM por período de 30 minutos ou perfusão de etanol na concentração de 25 mM por tempo integral. Etanol (GRUPO QUÍMICA cod:

01254), foi perfundido em ambos circuitos através de 2 bombas peristálticas (WATSON MARLOW 202) de 12 canais a um fluxo constante de 0.5ml/min. Os efeitos pressores foram tomados (mmHg), e comparados aos efeitos de controle em diversos protocolos experimentais.

Após a hepatectomia e os procedimentos de canulação dos vasos hepáticos, o fígado permaneceu por trinta minutos sob perfusão constante com a finalidade de se equilibrar as pressões arterial e portal. Ao se estabilizar, tomou-se as pressões de perfusão arterial e portal. Perfundiu-se etanol na concentração de 100 mM durante 30 minutos, quando se tomou novamente as pressões de perfusão. Após cessar a perfusão de etanol o sistema permaneceu novamente em repouso por 15 minutos, a fim de se estabelecer novo equilíbrio, onde foram verificadas as respectivas pressões de perfusão (fig.08).

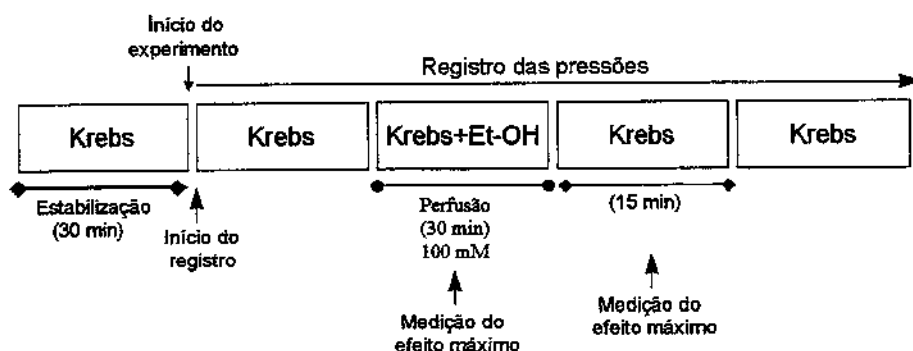


Figura 09 - Esquema de protocolo experimental com etanol a 100mM por 30 minutos

O mesmo procedimento foi tomado quando perfundiu-se etanol a 25 mM de maneira constante, com as medidas pressóricas sendo tomadas após 30 minutos de perfusão de etanol (fig. 09)

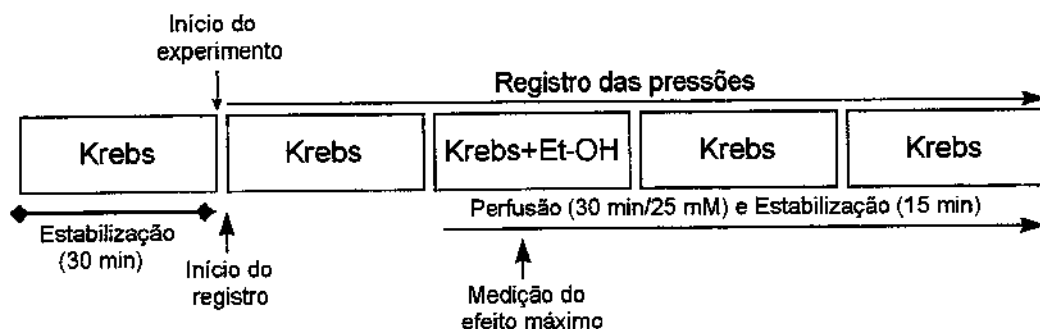
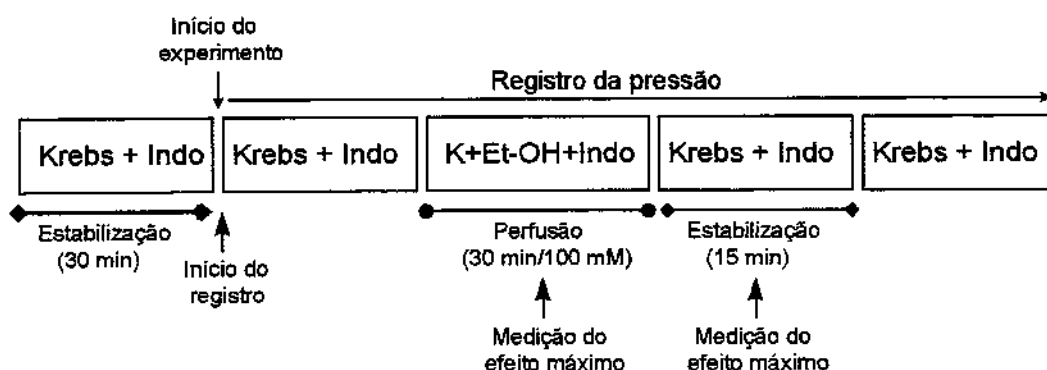


Figura 10 - Esquema de protocolo experimental com perfusão alcoólica de 25 mM de modo constante

3.3 - A modulação das respostas por óxido nítrico e prostaglandinas

Adicionou-se ao Krebs, indometacina (5.6 μ M, inibidor da ciclo oxigenase) e L-NAME (10 μ M, inibidor da NO sintase) para os experimentos com perfusão de etanol de 100 mM. As infusões destes antagonistas foram efetuadas em ambos leitros, permanecendo até ao final do experimento (fig. 10).



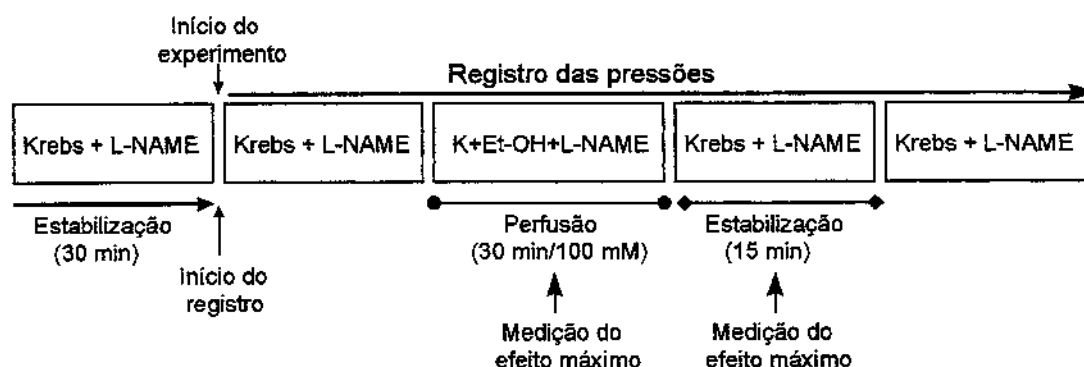


Figura 11 - Esquema de protocolo experimental com inibidores da ciclo oxigenase e óxido nítrico sintase

3.4 - Administração de agonistas de receptores de endotelina

As drogas utilizadas nos diversos experimentos foram diluídas em Krebs imediatamente antes de sua utilização, sendo as concentrações as que se seguem: noradrenalina (NA, 5.0 - 50 nmol), endotelina-1 (ET-1, agonista ET_A/ET_B , 40 - 400 pmol), endotelina-3 (ET-3, agonista preferencial ET_B , 40 - 400 pmol), IRL-1620 (agonista seletivo ET_B , 100 - 1000 pmol), sarafotoxina-6b (S6b, agonista preferencial ET_A , 40 - 400 pmol) e sarafotoxina-6c (S6c, agonista preferencial ET_B , 40 - 400 pmol). As drogas foram injetadas em bôlus de 1 ml, seguido de lavagem com 1 ml de Krebs para limpeza do circuito, perfazendo 2ml no total do bôlus. Em alguns experimentos foram utilizados apenas um única dose de agonista (ET-1, 400 pmol e IRL-1620, 1000 pmol) como controle positivo para determinados agonistas.

O efeito direto foi definido como aquele promovido pela droga no leito em que injetado, e o efeito indireto é aquele promovido pela droga no outro leito.

Por exemplo, quando a substância teste for injetada no leito arterial promove efeito direto na pressão arterial e efeito indireto na pressão portal. A medição foi através da leitura do registro contínuo de pressão, onde tomou-se como resposta a média aritmética (mmHg) do efeito na pressão de perfusão.

As drogas foram administradas através de dispositivos adaptados às mangueiras que conduziam o Krebs até o fígado. A cada droga diferente lavou-se o sistema com bôlus de Krebs no total de 2ml para a limpeza do sistema, com objetivo de não haver resíduos de drogas utilizadas anteriormente. Este estudo foi dividido em diversos protocolos experimentais que serão descritos a seguir. É importante frisar que a administração dos agonistas só era efetuada quando as pressões de perfusão de ambos circuitos tornava-se equilibrada e próxima ao basal.

3.5 - Administração de agonistas de receptores de endotelina em presença de tratamento alcoólico (100 mM)

Neste protocolo experimental, utilizou-se a perfusão simples de Krebs com perfusão de etanol a 100 mM. Os agonistas utilizados foram noradrenalina (NA, 5.0 - 50 nmol), endotelina-1 (ET-1, 40 - 400 pmol), sarafotoxina-6b (S6b, 40 - 400 pmol), endotelina-3 (ET-3, 40 - 400 pmol), IRL-1620 (100 - 1000 pmol), sarafotoxina-6c (S6c, 40 - 400 pmol) (fig. 11).

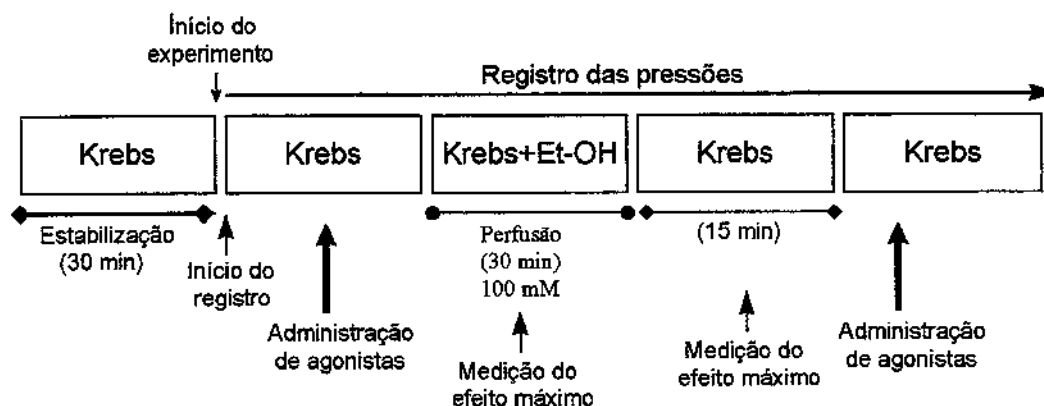


Figura 12 - Esquema representativo da administração de drogas em presença de tratamento alcoólico (100 mM)

3.5 - Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da cicloxigenase

Neste protocolo experimental, utilizou-se a perfusão de um inibidor da ciclo oxigenase, onde os agonistas utilizados foram: noradrenalina (NA, 5.0 - 50 nmol), endotelina-1 (ET-1, 40 - 400 pmol) e IRL-1620 (100 - 1000 pmol) (fig. 12)

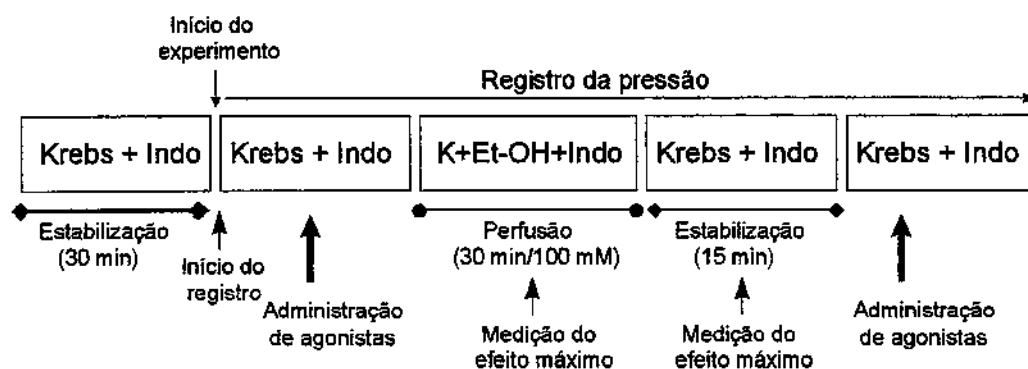


Figura 13 - Esquema representativo do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da Cicloxigenase

3.6 - Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM)

na vigência da inibição da óxido nítrico sintase

Neste protocolo experimental, utilizou-se a perfusão de um inibidor da óxido nítrico sintase e os agonistas utilizados foram: noradrenalina (NA, 5.0 - 50 nmol), endotelina-1 (ET-1, 40 - 400 pmol) e IRL-1620 (100 - 1000 pmol) (fig. 13)

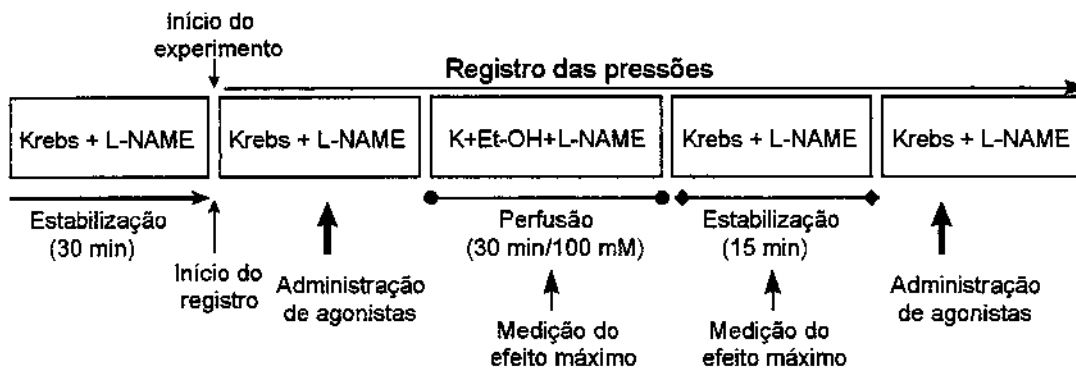


Figura 14 - Esquema representativo do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da óxido nítrico sintase

3.7 - Efeito do tratamento alcoólico contínuo com etanol (25 mM)

Neste experimento insere a perfusão constante de 25 mM de etanol e a utilização de noradrenalina (NA, 5.0 - 50 nmol), endotelina-1 (ET-1, 40 - 400 pmol) e IRL-1620 (100 - 1000 pmol) (fig.14).

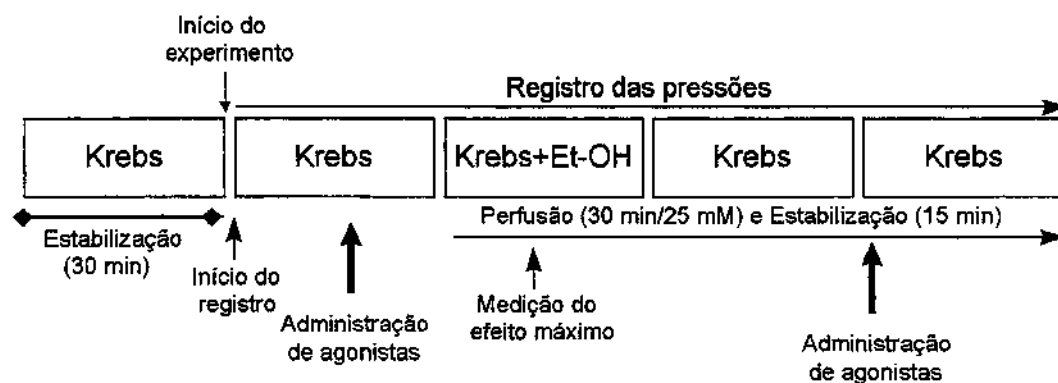


Figura 15 - Esquema representativo do tratamento alcoólico agudo com etanol (25 mM) de maneira contínua

3.2. Drogas Utilizadas

Substância	Procedência
Bicarbonato de Sódio	Merck
Cloreto de cálcio hexa hidratado	Merck
Cloreto de potássio	Merck
Endotelina-1:	Sigma Chemical Company
Fosfato de potássio	Merck
Endotelina-3	Sigma Chemical Company
Glicose	Sigma Chemical Company
Heparina	Roche
Sarafotoxina-6c	Sigma Chemical Company
IRL 1620: (Suc-[Glu ⁹ ,Ala ^{11,15}]-endothelin-1(8-21))	Sigma Chemical Company
Noradrenalina: (+) Arterenol	Sigma Chemical Company
Sarafotoxina-6b	Sigma Chemical Company
Sagatal®	May & Baker
Sulfato de magnésio hepta hidratado	Merck

3.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média aritmética das variações das resistências (razão entre pressão e fluxo total) $\pm$ erro padrão das médias (S.E.M) onde “n” indica o número de experimentos realizados. Os resultados foram analisados pelo teste “t” de Student pareado.

4 - RESULTADOS

Após a hepatectomia, canulação e estabilização do sistema por um período aproximado de trinta minutos, foram feitos os registos das pressões basais tanto do leito arterial quanto venoso e posteriormente, administrados os agonistas no intuito de se registrar seus efeitos máximos nas pressões vasculares hepáticas. Dessa maneira, os valores de resistência ao fluxo arterial e portal calculados serão demonstrados no início de cada seção.

4.1-Efeito do tratamento alcoólico agudo

A resistência ao fluxo arterial e portal basal foi calculada em 1.67 ± 0.21 mmHg.ml.min⁻¹ e 0.110 ± 0.023 mmHg.ml.min⁻¹, respectivamente. A perfusão de etanol a 100 mM nos leitos arterial e portal hepáticos durante 30 minutos resultou em discreto aumento da resistência ao fluxo arterial (1.81 ± 0.20 mmHg.ml mim⁻¹) e redução significativa na resistência ao fluxo portal (0.089 ± 0.019 mmHg.ml.mim⁻¹; $p < 0.05$). A resistência ao fluxo arterial e portal voltou aos valores basais 15 minutos após o término da perfusão de etanol (1.76 ± 0.18 mmHg.ml mim⁻¹ no circuito arterial e 0.104 ± 0.022 mmHg.ml.mim⁻¹ no circuito portal, Fig. 16).

4.2-Tratamento da preparação com indometacina

A perfusão de etanol (100 mM) adicionado ao inibidor da ciclo oxigenase (indometacina, 5,6 μ M) diluído em Krebs em ambos leitos não modificou significativamente a resistência ao fluxo arterial hepático (1.38 ± 0.43 mmHg.ml.mim⁻¹ antes e 1.52 ± 0.46 mmHg.ml.mim⁻¹ durante a perfusão

com etanol). Cerca de 15 minutos após o término da perfusão de etanol a resistência ao fluxo arterial se manteve semelhante aos valores basais (1.46 ± 0.44 mmHg.ml.mim⁻¹). No leito portal verificou-se que a perfusão com etanol, em presença de indometacina, resultou em diminuição significativa da resistência ao fluxo (0.113 ± 0.013 mmHg.ml.mim⁻¹ antes e 0.098 ± 0.015 mmHg.ml.mim⁻¹ durante a perfusão, $p < 0.05$). A resistência ao fluxo portal voltou aos valores basais 15 minutos após o término da perfusão de etanol (0.108 ± 0.014 mmHg.ml.mim⁻¹, Fig. 16).

4.3-Tratamento da preparação com L-NAME

A perfusão da preparação com etanol a 100 mM na presença do inibidor da síntese de NO (L-NAME, 10 μ M) não modificou as resistências aos fluxos arterial (1.26 ± 0.18 mmHg.ml.mim⁻¹ antes, 1.43 ± 0.21 mmHg.ml.mim⁻¹ durante e 1.36 ± 0.19 mmHg.ml.mim⁻¹ 15 min após a perfusão) e portal (0.12 ± 0.02 mmHg.ml.mim⁻¹ antes, 0.11 ± 0.01 mmHg.ml.mim⁻¹ durante, e 0.12 ± 0.02 mmHg.ml.mim⁻¹ 15 minutos após a perfusão com etanol, Fig.16).

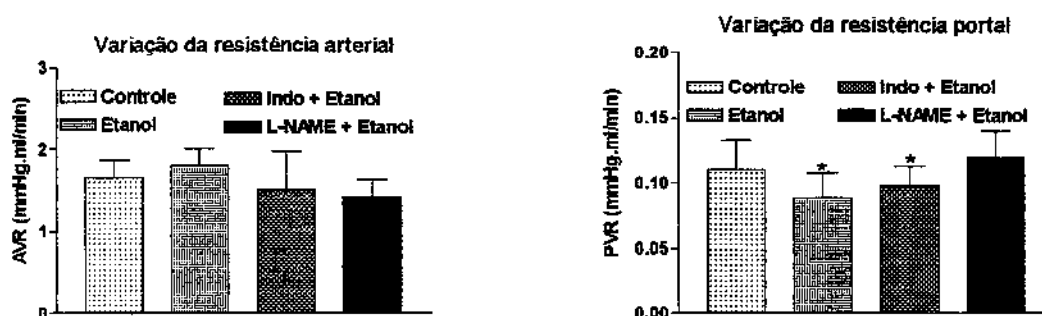


Figura 16 - Gráficos das variações das resistências arterial e portal

4.4-Efeito da administração contínua de etanol

A perfusão contínua da preparação com etanol (25 mM) em ambos leitos vasculares, proporcionou apenas alteração significativa da resistência ao fluxo portal a semelhança do que foi encontrado com a perfusão com etanol (100 mM). As alterações na resistência ao fluxo arterial hepática foi de 1.15 ± 0.18 mmHg.ml.mim⁻¹ antes da perfusão e 1.18 ± 0.2 mmHg.ml.mim⁻¹ após 15 minutos de perfusão de etanol a 25 mM., e para a resistência no leito portal, 0.137 ± 0.017 e 0.120 ± 0.01 mmHg.ml.mim⁻¹ ($p < 0.05$). (fig. 17)

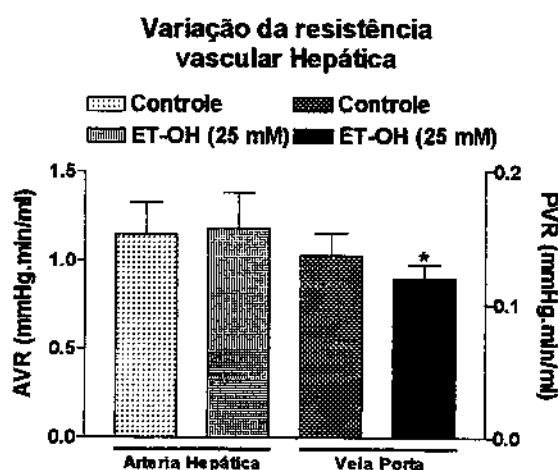


Figura 17 - Gráfico das variações das resistências arterial e portal (etanol 25 mM)

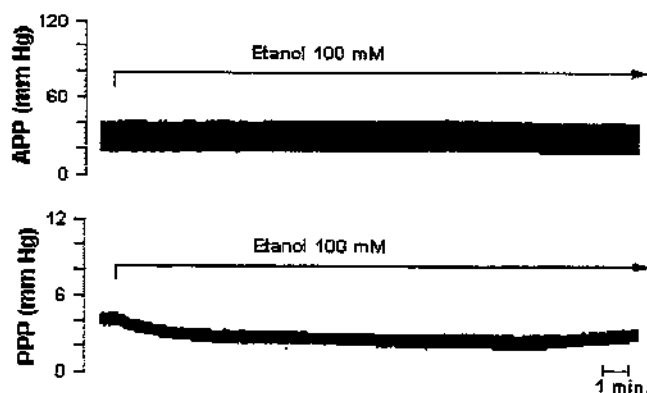


Figura 18 Traçado representativo mostrando o efeito da administração em perfusão de etanol (100mM) em ambos leitos. Notar a queda da pressão de perfusão da veia porta.

4.5 - Respostas dos agonistas nos leitos vasculares hepáticos perfundidos com Krebs

Os valores iniciais dos experimentos em que se utilizou o tratamento alcoólico na concentração de 100 mM por período de 30 minutos encontram-se na tabela 01 . Os resultados foram expressos em resistência ao fluxo no qual utilizou-se a razão entre o a pressão estabelecida no leito vascular e o fluxo total.

Dados / agonistas	Endotelina-1	IRL-1620	Noradrenalina
Peso animal	6.58 ± 0.67	7.10 ± 0.53	6.58 ± 0.67
Experimentos	06	05	06
Fluxo Arterial	18.67 ± 2.84	16.60 ± 1.91	18.67 ± 2.59
Fluxo Venoso	25.33 ± 4.02	22.80 ± 3.25	25.33 ± 3.67
H.A.P.P.	33.17 ± 4.28	51.20 ± 19.98	33.17 ± 4.28
P.V.P.P.	5.07 ± 0.66	5.84 ± 1.26	5.07 ± 0.66
A.V.R.	2.41 ± 0.90	1.99 ± 0.26	2.12 ± 0.63
P.V.R.	0.26 ± 0.10	0.32 ± 0.13	0.24 ± 0.07

Dados / agonistas	Endotelina-3	Sarafotoxina-6c	Sarafotoxina-6b
Peso animal	7.37 ± 1.31	6.37 ± 0.69	6.62 ± 0.51
Experimentos	04	04	04
Fluxo Arterial	22.00 ± 0.82	18.75 ± 1.52	20.25 ± 0.43
Fluxo Venoso	43.25 ± 2.79	42.00 ± 4.56	38.75 ± 4.30
H.A.P.P.	21.25 ± 1.43	32.50 ± 0.77	33.57 ± 2.59
P.V.P.P.	1.35 ± 0.20	2.30 ± 0.16	2.63 ± 0.12
A.V.R.	0.98 ± 0.11	1.77 ± 0.15	1.65 ± 0.13
P.V.R.	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Tabela 01 - Tabela representativa de peso do animal (Kg), números de experimentos para cada agonista, fluxos arterial e venoso iniciais (ml/min), pressão de perfusão da artéria hepática (HAPP, mmHg) e pressão de perfusão da veia porta (PVPP, mmHg), resistência arterial e portal (AVR e PVR, mmHg.ml.min⁻¹)

4.5.1 - Endotelina-1

A administração intra-arterial de ET-1(40 - 400 pmol, n = 06), proporcionou aumento da pressão de perfusão arterial hepática dependente da dose refletindo no leito venoso, um efeito vasoconstritor. Não foi observado qualquer efeito vasodilatador em resposta à ET-1. O efeito vasoconstritor arterial da ET-1 também não alterou a pressão de perfusão do leito venoso. As administrações intravenosas resultaram em aumento na

pressão de perfusão portal dependente da dose. Não foi observado qualquer efeito vasodilatador em resposta à ET-1 (tab. 02, fig. 28, 29 e 30)

4.5.2 - IRL-1620

As injeções intra-arteriais de IRL-1620 (100 - 1.000 pmol, n = 05) não alteraram a pressão de perfusão arterial e refletiram em vasoconstrição indireta do leito venoso. Entretanto, as injeções intravenosas de IRL-1620 causaram aumento da resistência ao fluxo dependente da dose, não acompanhada por efeitos indiretos na pressão de perfusão arterial. (fig.19, 20, 25, 29 e 30)

4.5.3 - Endotelina - 3

A administração intra-arterial de ET-3 (40 - 400 pmol, n = 04) resultou em resposta dependente da dose neste leito e alterando também a resistência ao fluxo vascular portal dependendo da dose utilizada. Quando administrada via portal, desencadeou aumento da resistência ao fluxo sendo dependente da dose utilizada, não causando alterações no leito arterial. (fig. 21, 22, 29 e 30)

4.5.4 - Sarafotoxina-6c

As administrações intra-arteriais de doses de sarafotoxina-6c (40 - 400 pmol, n = 04) resultaram em aumento da resistência ao fluxo arterial dependente da dose. Seus efeitos indiretos portais também foram marcados por aumento da resistência. As administrações intra-portais resultaram em aumento da resistência dependente da dose não sendo alteradas as resistências arteriais (fig.23 , 24 , 29 e 30).

4.5.5 - Sarafotoxina-6b

As administrações intra-arteriais (40 - 400 pmol, n = 04) resultaram em aumento na resistência dependente da dose. Seus efeitos indiretos portais também causaram aumentos na resistência dependente da dose. De maneira semelhante se comportou as respostas as injeções venosas do agonista, que evocaram respostas dependente da dose administrada sem no entanto alterar a pressão de perfusão arterial (fig. 26, 27, 29 e 30).

4.5.6 - Noradrenalina

As injeções intra-arteriais de noradrenalina (5,0 - 50.0 nmol, n = 06) resultaram em aumento na pressão de perfusão dependente da dose (fig. 4). Os efeitos arteriais foram acompanhados, em alguns casos, por diminuição da resistência no leito venoso ("reflexa") enquanto outros evocaram aumento da resistência. Quando as doses foram administradas via portal, propiciaram, de mesmo modo, alterações na pressão de perfusão venosa, sempre acompanhada pela dose administrada sem, no entanto, provocar alterações no leito arterial (tab. 03 e fig. 29 e 30)

4.6-Administração de drogas em presença de tratamento alcoólico (100 mM)

4.6.1-Endotelina-1

A perfusão da preparação com etanol não modificou as respostas vasoconstritoras arteriais e portais induzidas pela ET-1. (tab. 02 e fig. 28, 29 e 30)

Endotelina-1 (pmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	Controle	Etanol (100mM)	Controle	Etanol (100mM)
40	0.494 ± 0.484	0.176 ± 0.118	0.019 ± 0.020	0.000 ± 0.000
100	1.110 ± 0.672	1.515 ± 1.290	0.037 ± 0.041	0.028 ± 0.030
Portal Direto			Portal Indireto	
	Controle	Etanol (25mM)	Controle	Etanol (25mM)
40	0.022 ± 0.007	0.019 ± 0.007	0.000 ± 0.000	-0.002 ± 0.006
100	0.048 ± 0.013	0.043 ± 0.015	0.003 ± 0.003	0.011 ± 0.009

Tabela 02 - Resposta pressórica direta e indireta de ET-1

4.6.2-IRL-1620

O etanol não alterou o perfil de resposta do IRL-1620 no leito arterial. O efeito vasoconstritor venoso indireto causado pela injeção intra-arterial do IRL-1620 foi significativamente reduzida. Após o tratamento alcoólico as respostas venosas apresentaram-se reduzidas em todas as doses utilizadas ($p < 0.05$)(fig. 19 , 20 , 25 , 29 e 30).

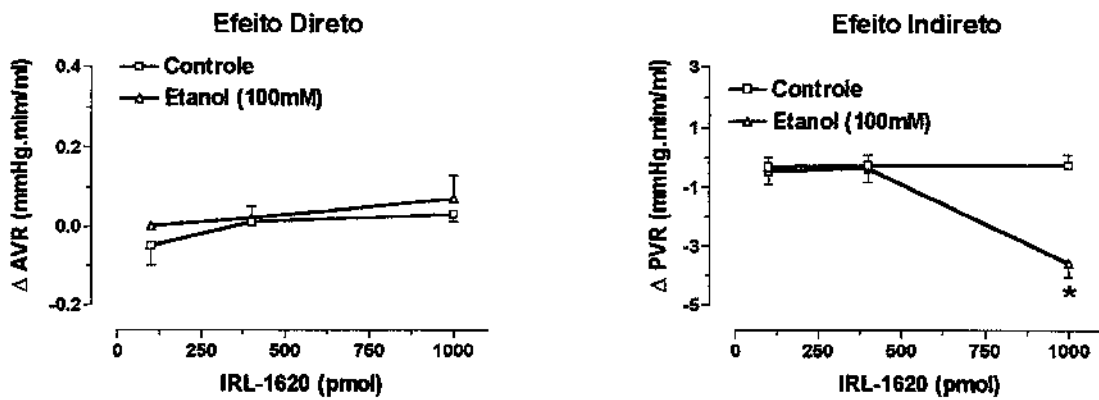


Figura 19 - Efeito do etanol (100mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 (100 - 1000 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais de IRL-1620, e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito venoso às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 5 experimentos.

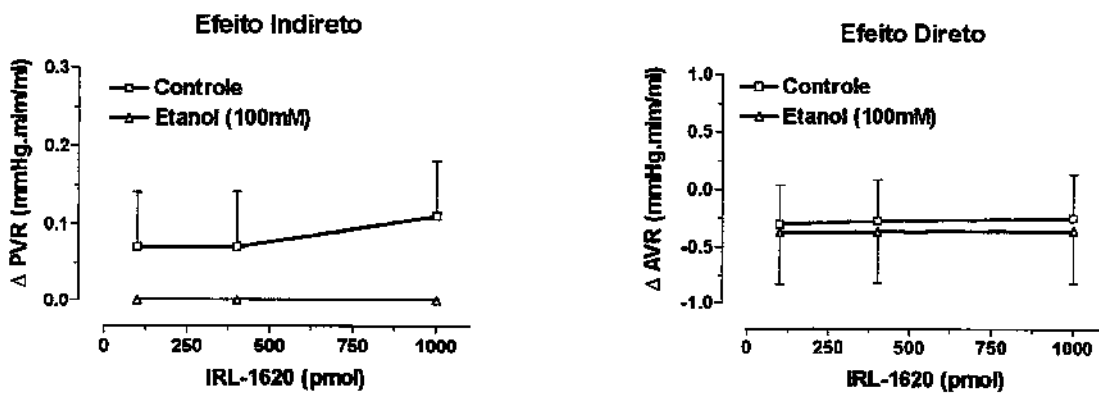


Figura 20 - Efeito do etanol (100mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 (100 - 1000 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-portais de IRL-1620, e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito arterial às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 5 experimentos.

4.6.3 - Endotelina-3

A pressão de perfusão arterial não se alterou após tratamento alcoólico agudo porém, seu efeito indireto portal foi alterado significativamente ($p<0.05$)

A administração intra-portal de ET-3 resultou em aumento da resistência ao fluxo portal dependente da dose, sendo este efeito reduzido significativamente ($p<0.05$) em todas as doses após tratamento alcoólico agudo, enquanto seu efeito indireto arterial não se alterou (fig. 21 , 22 , 29 e 30).

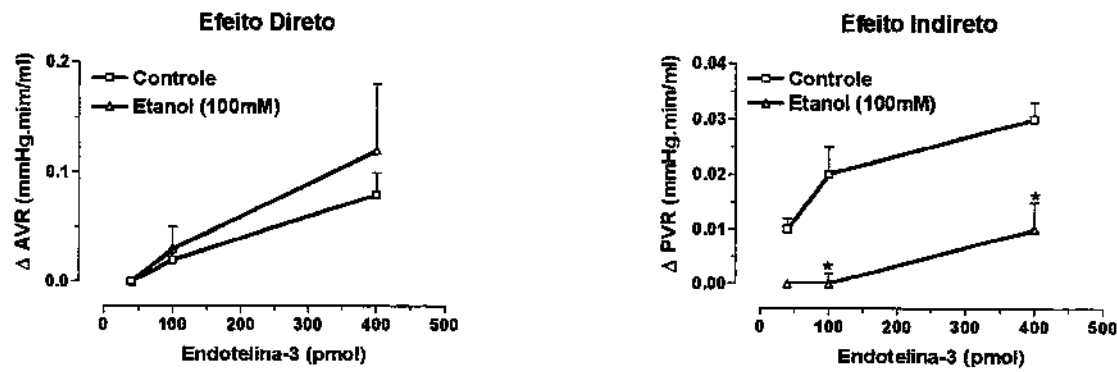


Figura 21 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de endotelina-3 (40-400 pmol).O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais de endotelina-3.e o gráfico a direita representa a curva das respostas indiretas no leito venoso às mesmas injeções . Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos.

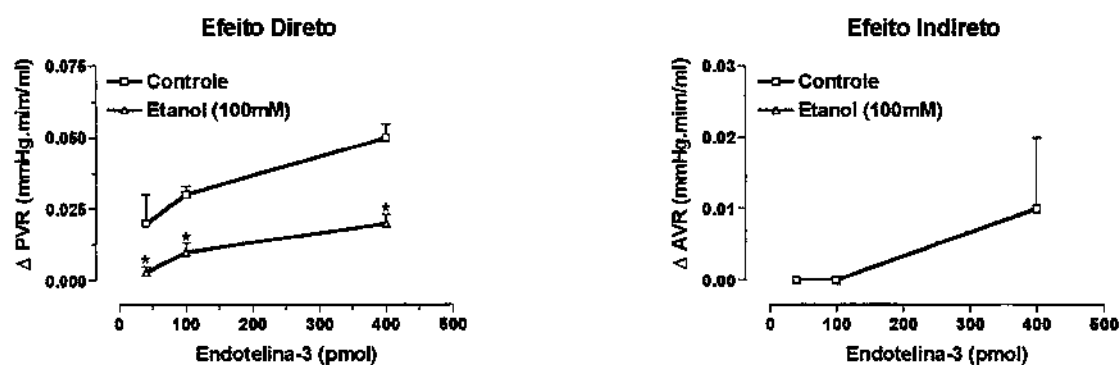


Figura 22 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de endotelina-3 (40-400 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-portais de endotelina-3, e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito arterial às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos

4.6.4-Sarafotoxina-6c

Após tratamento com etanol (100 mM) as respostas diretas não se alteraram porém houve uma queda na resistência portal na maior dose. No tocante as aplicadas no leito portal, as respostas apresentaram-se reduzidas nas maiores doses ($p < 0.05$). Seus efeitos indiretos arteriais foram reduzidos nas mesmas doses. Após tratamento alcoólico houveram uma reduções significativas ($p < 0.05$) na resistência vascular portal e arterial (fig. 23, 24, 29 e 30).

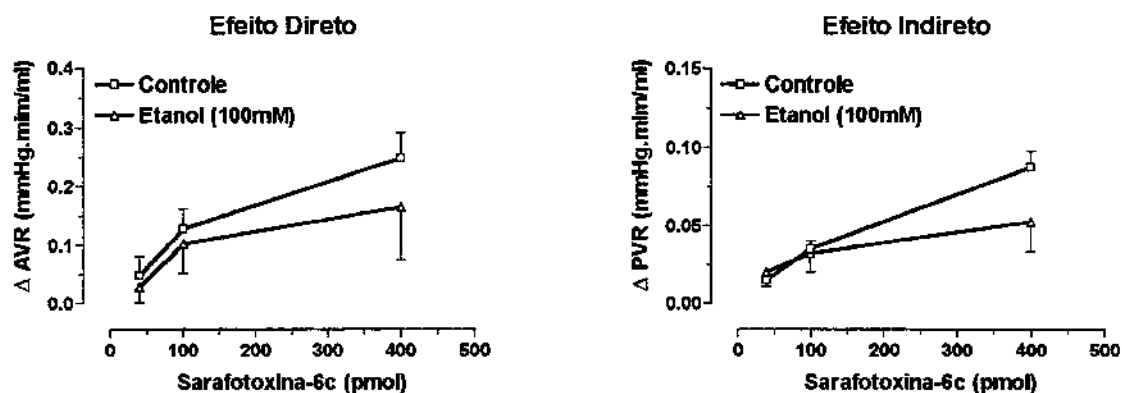


Figura 23 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de sarafotoxina-6c (40 - 400 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais de sarafotoxina-6c .e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito venoso às mesmas injeções . Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos.

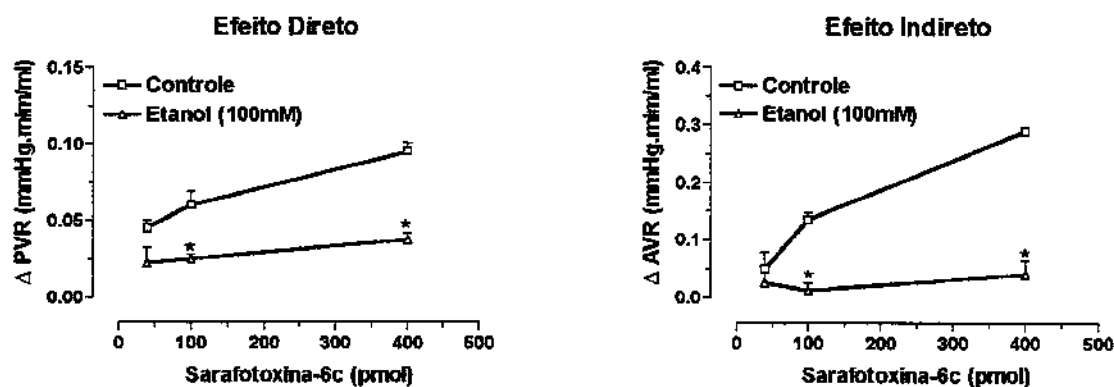


Figura 24 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de sarafotoxina-6c (40 - 400 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-portais de sarafotoxina-6c .e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito arterial às mesmas injeções . Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos.

Uma dose de IRL-1620 (1.000 pmol) foi utilizada como controle nos experimentos em que se utilizou o agonista endotelina-3 e sarafotoxina-6c, comportando-se conforme o gráfico abaixo

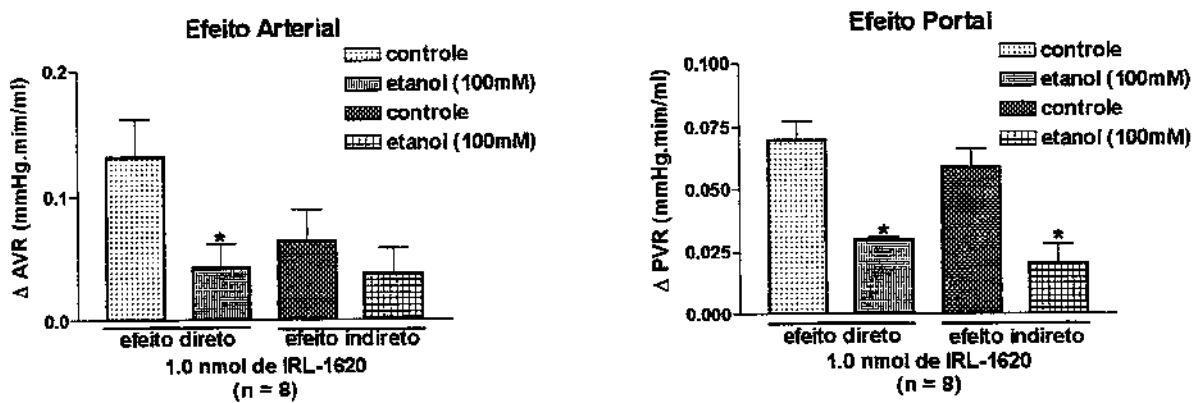


Figura 25 - Efeito do etanol (100mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 1000 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais (direta e indiretamente) de IRL-1620 e o gráfico a direita, representa a curva das respostas às injeções intra-portais (direta e indiretamente) . Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 8 experimentos. A dose deste agonista foi administrada concomitante nos protocolos com ET-3 e Stx-6c e serviu como controle de tais protocolos.

4.6.5-Sarafotoxina-6b

As administrações arteriais de doses não evocaram mudanças nas respostas após tratamento alcoólico agudo e administrações portais resultaram em aumento da resistência ao fluxo dependente da dose, sendo estes efeitos reduzidos significativamente em todas as doses administradas ($p < 0.05$) (fig. 26 , 27 , 29 e 30)

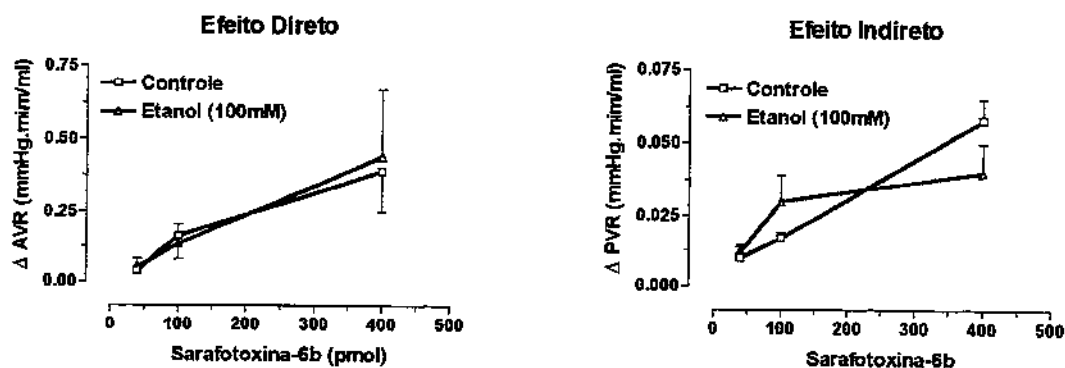


Figura 26 - Efeito do etanol (100mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de sarafotoxina-6b (40-400 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais de sarafotoxina-6b e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito venoso às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos.

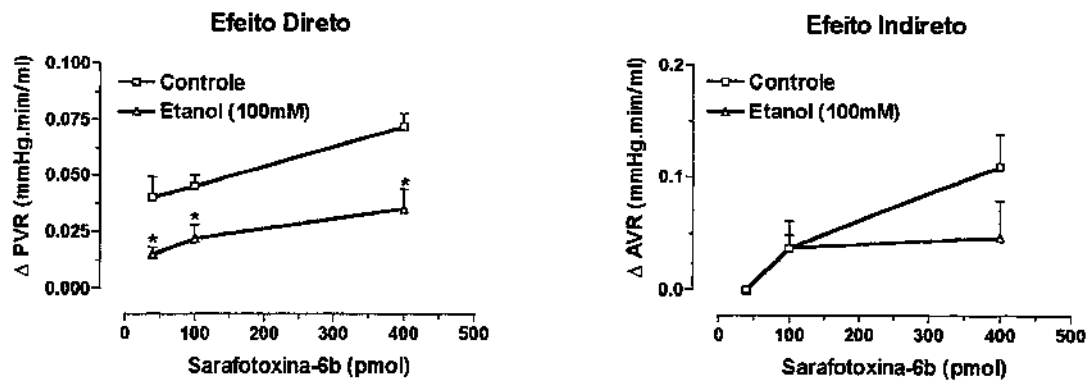


Figura 27 - Efeito do etanol (100mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de sarafotoxina-6b (40-400 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-portais de sarafotoxina-6b .e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito arterial às mesmas injeções . Cada ponto é a média ± SEM de 4 experimentos.

Uma dose de Endotelina-1 (400 pmol) foi utilizada como controle nos experimentos em que se utilizou o agonista sarafotoxina-6b, comportando-se de conforme o gráfico abaixo.

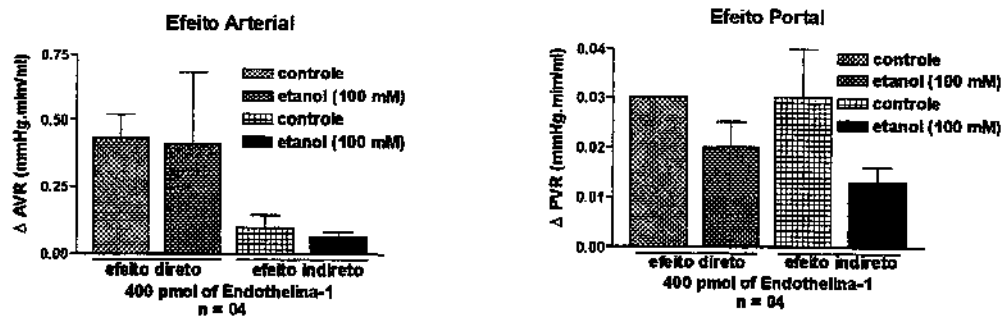


Figura 28 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de endotelina-1 (400 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais (direta e indiretamente) de endotelina-1 .e o gráfico a direita, representa a curva das respostas às injeções intra-portais (direta e indiretamente) . Cada ponto é a média ± SEM de 4 experimentos. A dose deste agonista foi administrada no protocolo com Stx-6b e serviu como controle do mesmo.

4.6.6 - Noradrenalina

Com o tratamento alcoólico as respostas, em ambos leitos, se mantiveram iguais as respostas de controle (tab. 03 e fig. 23 e 24)

Noradrenalina (nmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	Controle	Etanol (100mM)	Controle	Etanol (100mM)
5	0.449 ± 0.330	0.955 ± 0.633	0.000 ± 0.000	-0.037 ± 0.037
15	1.135 ± 0.508	1.846 ± 1.152	0.000 ± 0.000	-0.009 ± 0.009
50	2.480 ± 0.847	3.511 ± 1.443	0.023 ± 0.011	0.071 ± 0.055
Portal Direto			Portal Indireto	
	Controle	Etanol (25mM)	Controle	Etanol (25mM)
5	0.003 ± 0.016	0.000 ± 0.023	-0.016 ± 0.004	$-0.026 \pm 0.007^*$
15	0.011 ± 0.021	0.018 ± 0.026	-0.024 ± 0.006	-0.038 ± 0.010
50	0.035 ± 0.021	0.011 ± 0.031	-0.001 ± 0.034	-0.004 ± 0.036

Tabela 03 - Resposta pressórica direta e indireta de NA

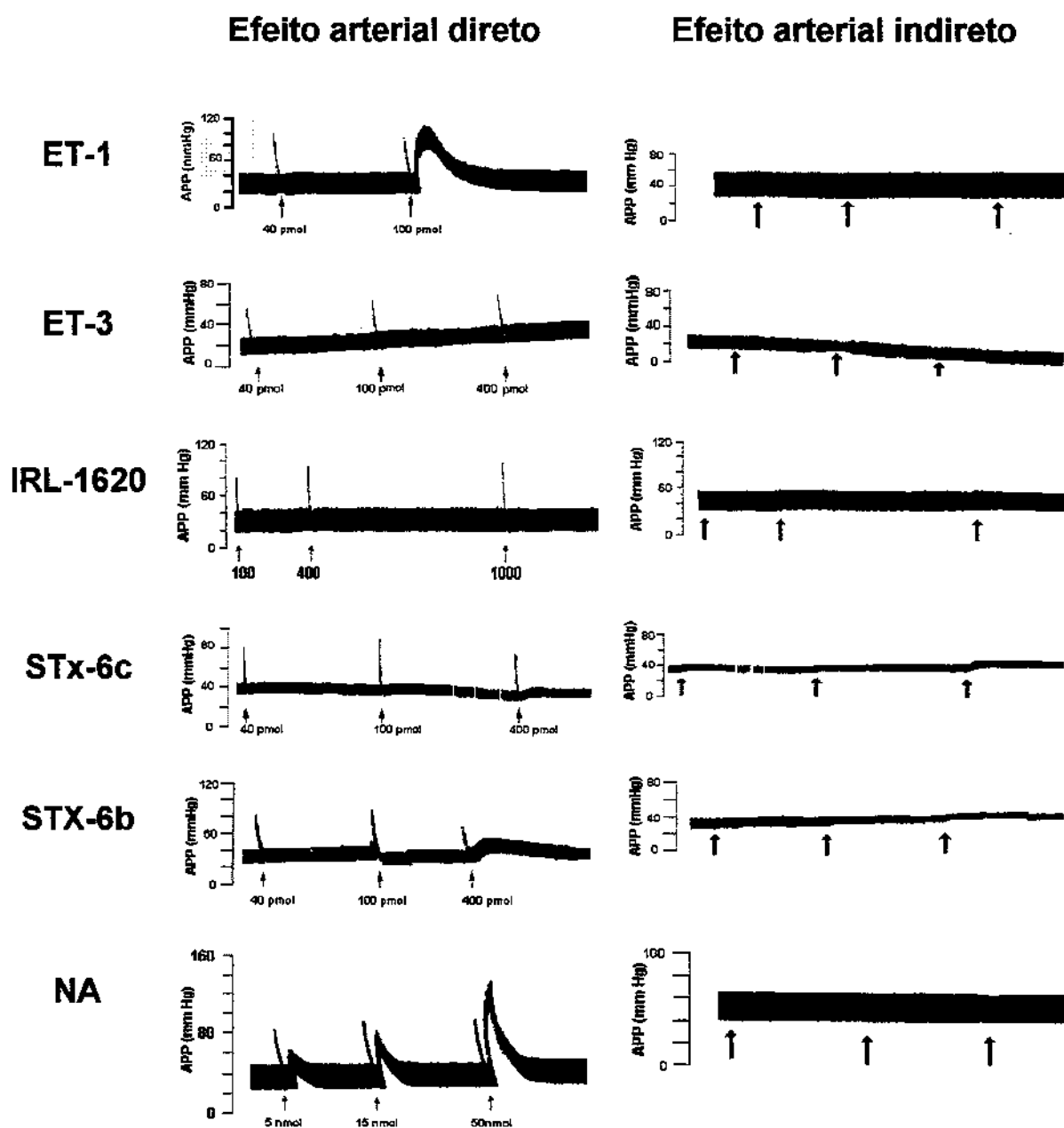


Figura 29 - Traçados representativos dos efeitos das drogas no leito arterial

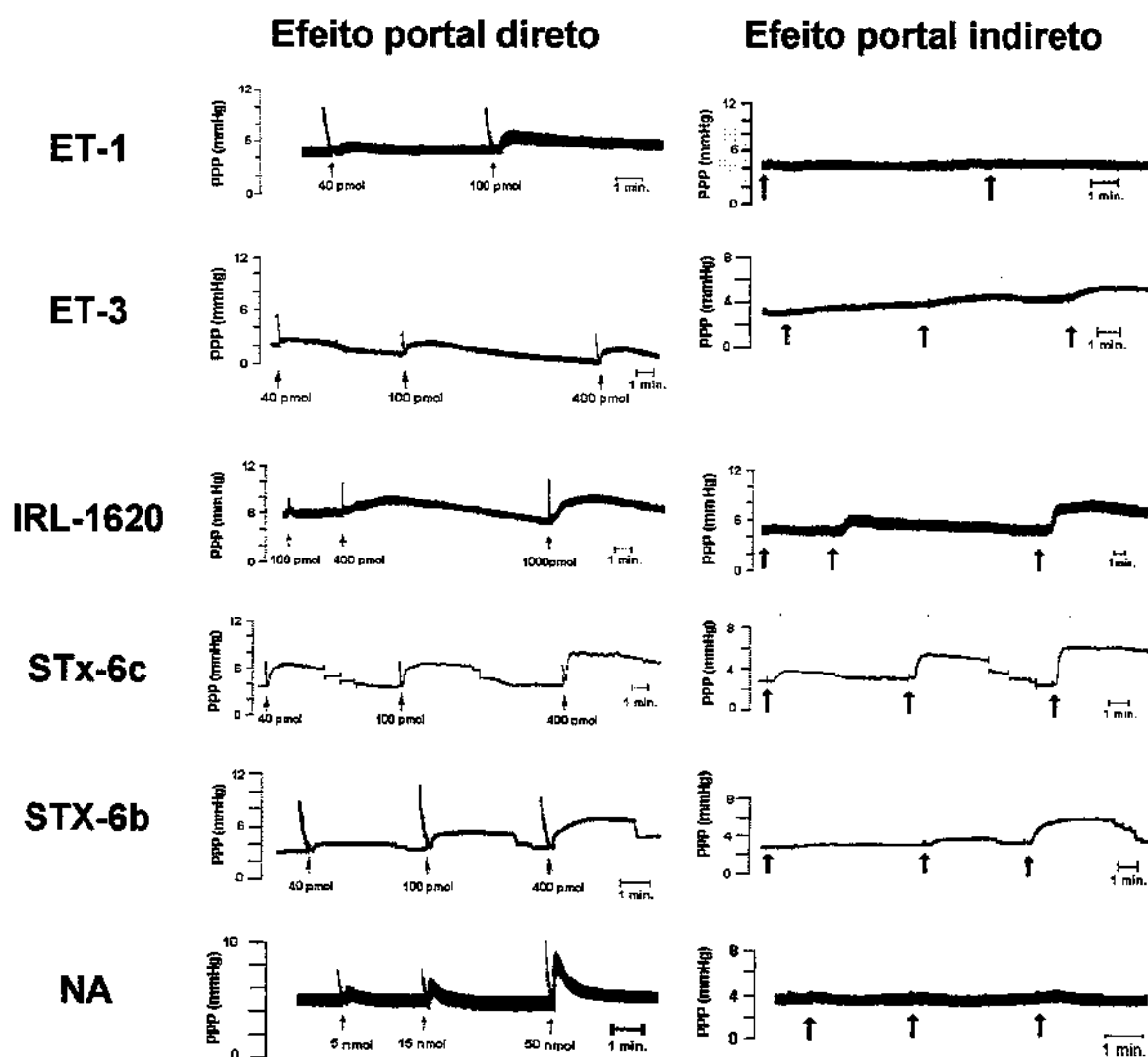


Figura 30 - Traçados representativos dos efeitos das drogas no leito portal

4.7-Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da Cicloxigenase

A tabela 04, indica os dados iniciais do protocolo em que se utilizou o tratamento alcoólico a concentração de 100 mM por período de 30 minutos sendo a perfusão de Krebs adicionado indometacina (5.6 μ M). Os resultados foram expressos em resistência ao fluxo no qual utilizou-se a razão entre o a pressão estabelecida no leito vascular e o fluxo de leito.

Dados / agonistas	Endotelina-1	IRL-1620	Noradrenalina
Peso animal	7.60 $\pm$ 1.26	7.10 $\pm$ 1.00	7.94 $\pm$ 0.81
Experimentos	08	05	05
Fluxo Arterial	17.60 $\pm$ 1.41	23.20 $\pm$ 2.27	20.50 $\pm$ 2.08
Fluxo Venoso	29.80 $\pm$ 1.04	33.00 $\pm$ 2.85	32.50 $\pm$ 1.76
H.A.P.P.	22.00 $\pm$ 2.63	23.00 $\pm$ 1.64	24.00 $\pm$ 2.21
P.V.P.P.	3.10 $\pm$ 0.32	2.92 $\pm$ 0.46	2.49 $\pm$ 0.25
A.V.R.	1.32 $\pm$ 0.20	1.03 $\pm$ 0.11	1.26 $\pm$ 0.17
P.V.R.	0.11 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.10	0.10 $\pm$ 0.02

Tabela 04 - Tabela representativa de peso do animal (Kg), números de experimentos para cada agonista, fluxos arterial e venoso iniciais (ml/min), pressão de perfusão da artéria hepática (HAPP, mmHg) e pressão de perfusão da veia porta (PVPP, mmHg), resistência arterial e portal (AVR e PVR, mmHg.ml.min⁻¹)

4.7.1-Endotelina-1

As administrações intra-arteriais de doses ET-1 ($n = 08$, 40 - 400 pmol) resultaram em aumento na pressão de perfusão arterial hepática dependente da dose não sendo alteradas as pressões de perfusão portal. Bólus de ET-1 intra-portal, de mesmo modo, resultaram em aumento das pressões de perfusão dependente da dose não alterando a pressão arterial hepática (tab. 05)

4.7.2 - IRL-1620

Bólus deste agonista ($n = 05$, 100 - 1.000 pmol) não alteraram a pressão de perfusão arterial. Tais administrações refletiram em aumento da pressão de perfusão no leito portal. As administrações portais propiciaram aumento da resistência ao fluxo dependente da dose não acompanhada por efeitos indiretos significativos na pressão de perfusão arterial (fig. 31 e 32).

4.7.3 - Noradrenalina

As injeções deste agonista aumentaram as resistências arteriais dependente da dose utilizada. Os efeitos arteriais foram acompanhados por diminuições nas resistências ("reflexa") do leito venoso e ou aumento das resistências portal. Em contra partida, os efeitos das administrações portais, apenas propiciaram aumento das pressões venosas sem no entanto alterar as pressões arteriais (tab. 06).

4.8 - Respostas após tratamento alcoólico agudo (100 mM) em vigência de inibidor da ciclooxigenase

4.8.1 - Endotelina-1

Após tratamento alcoólico, as respostas pressóricas arteriais e venosas não foram modificadas (tab 05).

Endotelina-1 (pmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	Indometacina	Indo +Et-OH	Indometacina	Indo +Et-OH
40	0.012 ± 0.012	0.033 ± 0.021	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
100	0.202 ± 0.080	0.267 ± 0.097	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
400	0.623 ± 0.182	0.790 ± 0.157	0.042 ± 0.019	0.031 ± 0.021
Portal Direto			Portal Indireto	
	Indometacina	Indo +Et-OH	Indometacina	Indo +Et-OH
40	0.009 ± 0.004	0.013 ± 0.004	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
100	0.022 ± 0.006	0.026 ± 0.003	0.002 ± 0.001	0.000 ± 0.000
400	0.045 ± 0.009	0.049 ± 0.006	0.005 ± 0.005	0.010 ± 0.008

Tabela 05 - Resposta pressórica direta e indireta de ET-1

4.8.2 - IRL-1620

O tratamento com etanol não alterou o perfil de resposta ao IRL-1620 no leito arterial ao contrário sofrido no leito portal indireto, que apresentaram-se significativamente reduzidos ($p < 0.05$). Após tratamento alcoólico, efeitos venosos direto causado pelo IRL-1620 foram significativamente reduzidos não se alterando as pressões arteriais. (fig. 31 e 32)

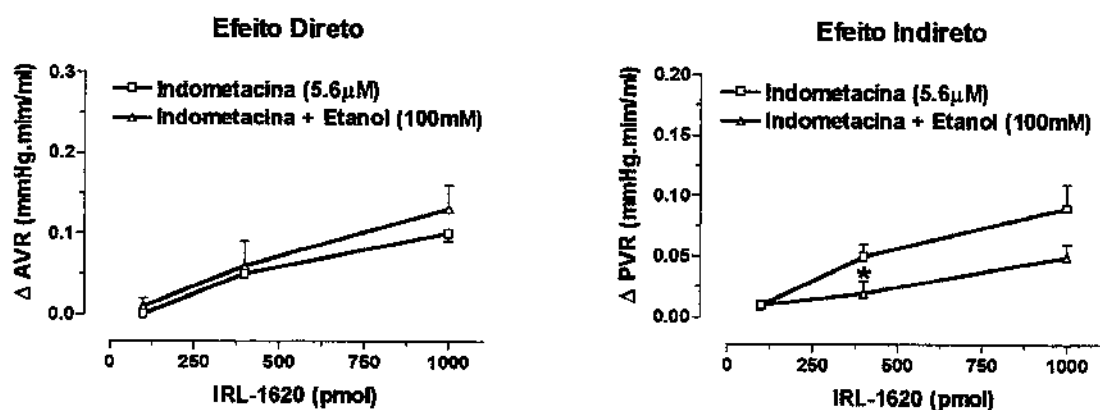


Figura 31 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 (100 - 1000 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais de IRL-1620, e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito venoso às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 5 experimentos

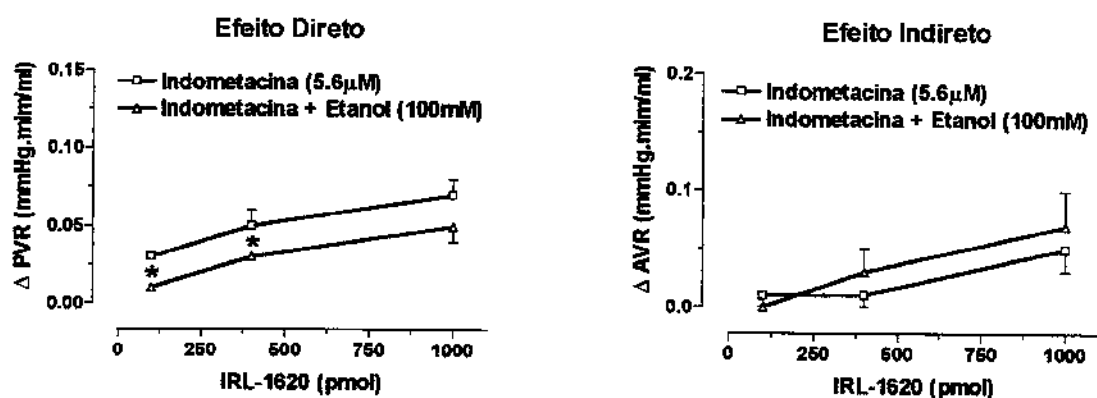


Figura 32 - Efeito do etanol (100 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 (100 - 1000 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-portais de IRL-1620, e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito arterial às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 5 experimentos

4.8.3 - Noradrenalina

O tratamento com etanol adicionado indometacina não foi capaz de alterar significativamente as respostas deste agonista (tab. 06).

Noradrenalina (nmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	Indometacina	Indo +Et-OH	Indometacina	Indo +Et-OH
5	0.096 ± 0.032	0.384 ± 0.075*	0.006 ± 0.006	0.006 ± 0.006
15	0.275 ± 0.047	0.972 ± 0.163*	0.043 ± 0.021	0.021 ± 0.012
50	1.063 ± 0.162	2.248 ± 0.434*	0.150 ± 0.039	0.064 ± 0.017*
Portal Direto			Portal Indireto	
	Indometacina	Indo +Et-OH	Indometacina	Indo +Et-OH
5	0.006 ± 0.007	0.020 ± 0.002	-0.002 ± 0.001	-0.011 ± 0.003
15	0.027 ± 0.004	0.032 ± 0.005	0.000 ± 0.005	-0.014 ± 0.006
50	0.045 ± 0.008	0.044 ± 0.006	0.001 ± 0.007	-0.011 ± 0.010

Tabela 06 - Resposta pressórica direta e indireta de NA

4.9-Efeito do tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da Óxido nítrico sintase

A tabela 07, diz respeito os dados iniciais do protocolo em que se utilizou o tratamento alcoólico a concentração de 100 mM por período de 30 minutos sendo a perfusão de Krebs adicionado L-NAME (10⁻⁵M). Os resultados foram expressos em resistência ao fluxo no qual utilizou-se a razão entre o a pressão estabelecida no leito vascular e o fluxo total.

Dados / agonistas	Endotelina-1	IRL-1620	Noradrenalina
Peso animal	9.38 ± 1.60	8.50 ± 0.46	7.75 ± 0.72
Experimentos	04	04	04
Fluxo Arterial	28.50 ± 1.55	21.00 ± 2.35	24.75 ± 2.14
Fluxo Venoso	35.00 ± 2.86	39.00 ± 5.20	40.00 ± 4.40
H.A.P.P.	25.75 ± 4.50	30.75 ± 3.92	28.25 ± 3.71
P.V.P.P.	1.88 ± 0.19	4.35 ± 0.70	2.55 ± 0.57
A.V.R.	0.91 ± 0.15	1.60 ± 0.41	1.15 ± 0.14
P.V.R.	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.06 ± 0.01

Tabela 07 - Tabela representativa de peso do animal (Kg), números de experimentos para cada agonista, fluxos arterial e venoso iniciais (ml/min), pressão de perfusão da artéria hepática (HAPP, mmHg) e pressão de perfusão da veia porta (PVPP, mmHg), resistência arterial e portal (AVR e PVR, mmHg.ml.min⁻¹)

4.9.1 - Endotelina-1

As administrações intra-arteriais de diferentes doses de ET-1(40 - 400 pmol, n = 04) produziram aumento das resistências dependente da dose, medido pelas mudanças nas resistências do leito vascular ao fluxo determinado na bomba de perfusão. Tal efeito foi de modo semelhante observado no leito portal (efeito indireto) enquanto as administrações intra-portais não produziram mudanças nas resistências do leito vascular ao fluxo dependente da dose (tab. 08).

4.9.2 - IRL-1620

As injeções intra-arteriais de IRL-1620, provocaram aumento das resistências dependente da dose, porém pouco pronunciados. Os efeitos indiretos ("reflexo") demonstraram-se eficazes causando acentuadas alterações nas resistências portais. No leito venoso, as injeções de IRL-1620, produziram alterações dependente da dose e de mesmo modo apresentaram-se suas respostas reflexas arteriais (tab. 09)

4.9.3 - Noradrenalina

Injeções de noradrenalina propiciaram aumento nas pressões de perfusão dependente da dose. Estes efeitos foram acompanhados por diminuições das pressões de perfusão "reflexa" no leito portal. As injeções venosas do agonista acompanharam o perfil de resposta de outros protocolos apresentando respostas dependendo da dose administrada (tab. 10).

4.10 -Respostas após tratamento alcoólico agudo com etanol (100 mM) na vigência da inibição da Oxido nítrico sintase

4.10.1 - Endotelina-1

Ambas administrações, arterial e venosa, não foram capazes de alterar as respostas pressóricas de controle (tab. 08)

Endotelina-1 (pmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	L-NAME	L-NAME+Et-OH	L-NAME	L-NAME+Et-OH
40	0.027 ± 0.164	0.588 ± 0.338	-0.021 ± 0.021	0.042 ± 0.026
100	0.204 ± 0.143	1.831 ± 0.982	0.004 ± 0.032	0.092 ± 0.32
400	0.739 ± 0.454	20342 ± 2.143	0.033 ± 0.019	0.152 ± 0.091
Portal Direto			Portal Indireto	
	L-NAME	L-NAME+Et-OH	L-NAME	L-NAME+Et-OH
40	0.023 ± 0.006	0.029 ± 0.006	0.001 ± 0.004	0.006 ± 0.004
100	0.046 ± 0.011	0.047 ± 0.013	0.008 ± 0.010	0.019 ± 0.007
400	0.103 ± 0.026	0.078 ± 0.028	0.031 ± 0.019	0.020 ± 0.008

Tabela 08 - Resposta pressórica direta e indireta de ET-1

4.10.2 -IRL-1620

Após tratamento alcoólico, as respostas arteriais ao IRL-1620, mantiveram-se inalteradas porém apenas uma das doses proporcionou aumento significativo em relação ao seu controle. Suas respostas reflexas (portal) apresentaram-se inalteradas fato idêntico ocorrido através de administrações venosas e suas respostas indiretas (tab. 09).

IRL-1620 (pmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	L-NAME	L-NAME+Et-OH	L-NAME	L-NAME+Et-OH
100	0.028 ± 0.017	0.087 ± 0.051	0.011 ± 0.011	0.000 ± 0.000
400	0.087 ± 0.017	0.184 ± 0.036*	0.031 ± 0.021	0.020 ± 0.012
1000	0.210 ± 0.069	0.240 ± 0.063	0.084 ± 0.062	0.041 ± 0.024
Portal Direto			Portal Indireto	
	L-NAME	L-NAME+Et-OH	L-NAME	L-NAME+Et-OH
100	0.014 ± 0.005	0.006 ± 0.006	0.004 ± 0.003	0.001 ± 0.005
400	0.035 ± 0.017	0.018 ± 0.014	0.023 ± 0.011	0.012 ± 0.011
1000	0.056 ± 0.020	0.037 ± 0.015	0.053 ± 0.024	0.024 ± 0.015

Tabela 09 - Resposta pressórica direta e indireta de IRL-1620

4.10.3 - Noradrenalina

A infusão de etanol não modificou as respostas arteriais como também não alterou as portais quando comparada a sua resposta controle. O mesmo foi observado quanto as suas respostas reflexas (arterial e portal), que se comportaram de maneira similares em relação as preparações não tratadas com etanol (tab. 10)

Observou-se aumento significativo ($p < 0.05$) após tratamento com etanol em todas as doses e o efeito portal reflexo permaneceu sem alteração.

Noradrenalina (nmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	L-NAME	L-NAME+Et-OH	L-NAME	L-NAME+Et-OH
5	0.235 ± 0.114	$0.852 \pm 0.208^*$	0.020 ± 0.012	0.037 ± 0.014
15	0.750 ± 0.050	$1.791 \pm 0.308^*$	0.063 ± 0.025	0.116 ± 0.028
50	2.192 ± 0.229	$3.866 \pm 0.481^*$	0.142 ± 0.048	0.208 ± 0.020
Portal Direto			Portal Indireto	
	L-NAME	L-NAME+Et-OH	L-NAME	L-NAME+Et-OH
5	0.016 ± 0.006	0.012 ± 0.011	-0.005 ± 0.004	$-0.021 \pm 0.005^*$
15	0.028 ± 0.009	0.020 ± 0.015	-0.007 ± 0.005	$-0.025 \pm 0.008^*$
50	0.031 ± 0.003	0.025 ± 0.017	-0.009 ± 0.013	-0.027 ± 0.015

Tabela 10 - Resposta pressórica direta e indireta de NA

4.11 -Administração de drogas em presença de tratamento alcoólico (25 mM) de maneira contínua

A tabela 11, diz respeito os dados iniciais do protocolo em que se utilizou o tratamento alcoólico a concentração de 25 mM. Os resultados foram expressos em resistência ao fluxo no qual utilizou-se a razão entre o a pressão estabelecida no leito vascular e o fluxo total.

Dados / agonistas	Endotelina-1	IRL-1620	Noradrenalina
Peso animal	11.25 ± 2.17	8.13 ± 1.28	12.20 ± 2.60
Experimentos	06	04	05
Fluxo Arterial	23.00 ± 1.90	27.00 ± 1.47	22.00 ± 2.47
Fluxo Venoso	33.14 ± 3.14	40.75 ± 2.14	28.80 ± 2.06
H.A.P.P.	23.29 ± 2.15	27.50 ± 3.77	20.80 ± 2.33
P.V.P.P.	3.24 ± 0.38	4.20 ± 0.27	3.26 ± 0.43
A.V.R.	1.06 ± 0.15	1.04 ± 0.18	0.99 ± 0.16
P.V.R.	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.02

Tabela 11 - Tabela representativa de peso do animal (Kg), números de experimentos para cada agonista, fluxos arterial e venoso iniciais (ml/min), pressão de perfusão da artéria hepática (HAPP, mmHg) e pressão de perfusão da veia porta (PVPP, mmHg), resistência arterial e portal (AVR e PVR, mmHg.ml.min⁻¹)

4.11.1-Endotelina-1

Injeções de ET-1 (40 - 400 pmol, n = 06) intra-arteriais propiciaram acréscimo nas pressões de perfusão de modo dependente da dose sem efeitos indiretos, fato este, repetido quando os bôlus foram administrados no leito portal (tab.12).

4.11.2 - IRL-1620

As administrações intra-arteriais (100 - 1.000 pmol, n = 04) não alteraram as pressões de perfusão arterial. Estas injeções refletiram em aumento das pressões de perfusão portal de modo indireto. Doses deste agonista ET_B no leito portal, produziram, neste leito, aumento das resistências dependente da dose sem, no entanto, produzirem quaisquer efeitos reflexos (fig. 33 e 34)

4.11.3 - Noradrenalina

As injeções intra-arteriais de noradrenalina desencadearam respostas vasopressoras positivas dependente da dose utilizada , enquanto suas respostas reflexas foram de decréscimos nas pressões de perfusão portal. As respostas do leito portal, quando injetadas doses deste agonista foram de mesmo modo dependentes da dose, não apresentando alterações reflexas arteriais (tab. 13).

4.12 -Resposta vasculares as administrações de drogas em presença de tratamento alcoólico (25 mM) de maneira contínua

4. 12.1 - Endotelina -1

A perfusão de etanol após 30 minutos, não foram capazes de alterar as respostas deste agonista.(tab. 12)

Endotelina-1 (pmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	Controle	Etanol (25mM)	Controle	Etanol (25mM)
40	0.010 ± 0.010	0.183 ± 0.081	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
100	0.210 ± 0.080	0.566 ± 0.165	0.006 ± 0.006	0.051 ± 0.034
400	0.916 ± 0.301	1.625 ± 0.382	0.037 ± 0.037	0.068 ± 0.055
Portal Direto			Portal Indireto	
	Controle	Etanol (25mM)	Controle	Etanol (25mM)
40	0.010 ± 0.003	0.015 ± 0.005	0.000 ± 0.000	0.003 ± 0.002
100	0.023 ± 0.005	0.034 ± 0.005	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.004
400	0.054 ± 0.012	0.095 ± 0.027	0.009 ± 0.005	0.019 ± 0.008

Tabela 12 - Resposta pressórica direta e indireta de ET-1

4.12.2 - IRL-1620

Não se observou qualquer modificação nas respostas arteriais porém as pressões de perfusão portal reduziram-se significativamente em relação as pressões de perfusão portal de controle ($p < 0.05$), sendo estas administrações portal ou arterial. (fig.33 e 34)

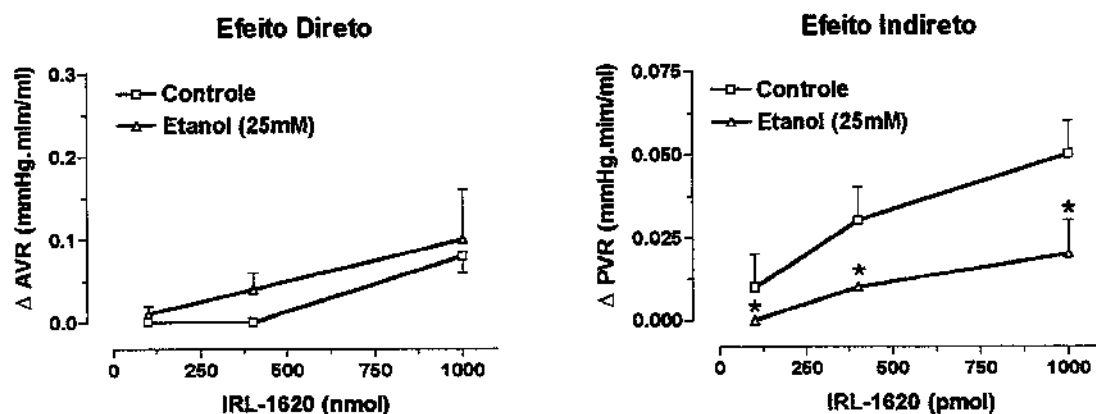


Figura 33 - Efeito do etanol (25 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 (100 - 1000 pmol). O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-arteriais de IRL-1620, e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito venoso às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos

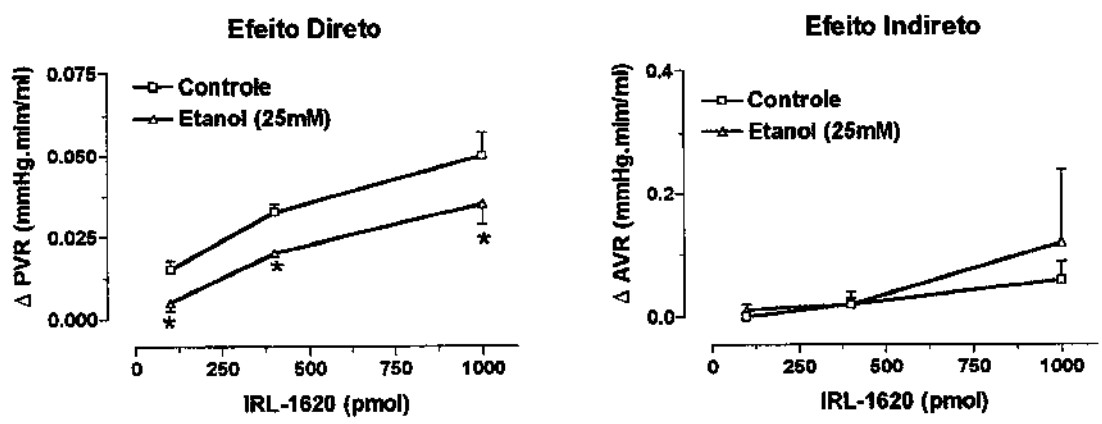


Figura 34 - Efeito do etanol (25 mM) sobre a resposta vascular induzida pela administração de IRL-1620 (100 - 1000 pmol).O gráfico a esquerda, representa a curva das respostas às injeções intra-portais de IRL-1620,e o gráfico a direita, representa a curva das respostas indiretas no leito arterial às mesmas injeções. Cada ponto é a média $\pm$ SEM de 4 experimentos

4.12.3 - Noradrenalina

De modo semelhante aos anteriores o tratamento alcoólico não foi capaz de alterar as pressões de controle (tab. 13).

Noradrenalina (nmol)				
Arterial Direto			Arterial Indireto	
	Controle	Etanol (25mM)	Controle	Etanol (25mM)
5	0.308 $\pm$ 0.109	0.950 $\pm$ 0.319	0.000 $\pm$ 0.000	0.007 $\pm$ 0.007
15	0.888 $\pm$ 0.319	1,920 $\pm$ 0.716	0.010 $\pm$ 0.010	0.013 $\pm$ 0.013
50	1.927 $\pm$ 0.625	3.400 $\pm$ 1.122	0.020 $\pm$ 0.020	0.111 $\pm$ 0.038
Portal Direto			Portal Indireto	
	Controle	Etanol (25mM)	Controle	Etanol (25mM)
5	0.009 $\pm$ 0.013	0.051 $\pm$ 0.031	-0.002 $\pm$ 0.002	-0.005 $\pm$ 0.004
15	0.016 $\pm$ 0.015	0.074 $\pm$ 0.044	-0.006 $\pm$ 0.007	-0.012 $\pm$ 0.006
50	0.032 $\pm$ 0.016	0.112 $\pm$ 0.063	-0.011 $\pm$ 0.012	-0.019 $\pm$ 0.010

Tabela 13 - Resposta pressórica direta e indireta de NA

5 - DISCUSSÃO

A investigação dos mecanismos de controle da resistência ao fluxo portal hepático é de grande relevância. Vários mediadores tem sido implicados nesse fenômeno como eicosanóides, óxido nítrico e endotelina. As endotelinas podem ser formadas em vários tipos de células, dentre elas o endotélio, e seus efeitos podem ser observados tanto *in vivo* como *in vitro*.

O endotélio vascular, camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sangüíneos, constitui uma barreira estrategicamente situada entre a circulação e a parede vascular. Não considerado apenas como uma barreira de difusão que controla a permeabilidade entre o sangue circulante, a parede vascular e o tecido intersticial, exerce também grande variedade de funções biológicas, como: a) barreira permeável e seletiva contra migração para o interior da parede vascular de certas espécies moleculares e componentes celulares, promovendo um ambiente controlado; b) secreção de fatores mitogênicos, bem como de inibidores de crescimento; c) produção de fatores anti-trombogênicos e trombogênicos; d) metabolismo e clearance de lipoproteínas; e) metabolismo e inativação de catecolaminas; f) síntese de substâncias vasodilatadoras e antiplaquetárias e g) síntese de substâncias vasoconstritoras.

Os dados existentes sugerem que as endotelinas participam no desenvolvimento de diversas patologias hepáticas tais quais hepatite alcoólica, fibrose hepática, hepatite congênita, hipertensão portal idiopática e em

processos patológicos do sistema cardiovascular como insuficiência cardíaca congestiva, pericardite constrictiva e lesão membranosa ou trombótica da veia cava inferior. Dentre este universo de processos patológicos a hepatite alcoólica se destaca. O etanol é consumido amplamente, podendo conduzir a dano hepático (CLONNINGER et al, 1989). Além disso, o etanol afeta potencialmente a regulação da hemodinâmica hepática (OSHITA et al, 1993).

Os resultados deste trabalho demonstram que a perfusão hepática com etanol, tanto em concentração de 100mM por período de 30 minutos quanto em perfusão constante de 25 mM em ambos leitos, produz redução significativa na pressão de perfusão portal em fígado canino isolado. Esse efeito foi relacionado à liberação de óxido nítrico, já que a adição, em perfusão, do inibidor de síntese de óxido nítrico (L-NAME) aboliu este efeito.

A utilização de endotelina-1 (agonista misto de receptores de endotelina ET_A e ET_B) em leito arterial hepático proporcionou aumento da pressão neste leito. O padrão dessas respostas seguiu as observações de FARO et al (1995), sendo dependente da dose administrada e de longa duração, tendo a endotelina-1 efeito mais prolongado quando comparado aos outros agonistas utilizados (sarafotoxina-6b, sarafotoxina-6c [STX-6b, agonista preferencial ET_A ; STX-6c, preferencial ET_B , KLOOG et al, 1989], endotelina-3 (agonista preferencial ET_B) e IRL-1620 (agonista ET_B). Da mesma forma, o leito portal respondeu às administrações arteriais de endotelina-1, confirmando, com isto, a existência de comunicação entre os leitos vasculares hepáticos. As administrações no leito venoso propiciaram alterações pressóricas portais da

mesma forma, dose dependente, sem, no entanto, causar efeito indireto arterial. O tratamento alcóolico não alterou o padrão de resposta dos leitos vasculares estudados após administração de agonistas de receptores de endotelina.

As respostas vasculares as injeções de endotelina-1 foram de mesma forma dose dependente quando as preparações foram tratadas com inibidores da cicloxigenase e óxido nítrico sintase. Em nenhuma das preparações se observou alterações ao tratamento com etanol, permanecendo as respostas vasculares idênticas aquelas encontradas em seu controle, concluindo que o etanol não foi capaz de modificar as respostas vasculares induzidas pela endotelina-1.

Por outro lado, a administração intra-arterial de IRL-1620, endotelina-3 e sarafotoxina-6c, não alterou significativamente a resistência ao fluxo arterial. Entretanto, observou-se aumento significativo na resistência vascular portal, identificando mais uma vez a inter-comunicação entre os leitos vasculares hepáticos. A administração intraportal desses agonistas resultou em aumento significativo da resistência ao fluxo portal, como observado com a administração intra-arterial desses compostos. Não foram observadas alterações na resistência arterial nessas condições. FARO et al. (1995), utilizando fígado isolado e perfundido de cão, concluiu que existe um predomínio de receptores ET_A no leito arterial. Dessa maneira, os achados deste trabalho estão em concordância.

O tratamento da preparação com indometacina (inibidor da cicloxigenase) e L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) não afetou as

respostas obtidas pela administração de IRL-1620. Após o tratamento alcoólico, as respostas portais a este agonista apresentaram-se diminuídas significativamente. Tal fato se repetiu ao se infundir concomitantemente indometacina, atestando que o etanol é capaz de alterar significativamente as respostas mediadas por receptores ET_B e que os eicosanóides não estariam envolvidos neste processo. Entretanto, a perfusão da preparação com L-NAME restaurou sua capacidade de produzir vasoconstrição em resposta aos agonistas destes receptores (ET_B). Isso sugere que o óxido nítrico estaria envolvido na modulação da resposta vascular portal aos agonistas de receptores ET_B após o tratamento alcoólico agudo.

Em contraste, observações feitas em fígado isolado de ratos indicam que a infusão de etanol aumenta a pressão portal de forma concentração-dependente. Este quadro de hipertensão portal é decorrente de vasoconstrição hepática e pode ser revertido pelo nitroprussiato de sódio (HIJIOKA *et al* 1991). Este autor afirma que, em concentrações superiores a 25 mM, o etanol determina aumento significativo da pressão portal. Em presença de um anticorpo anti-ET-1, o aumento da pressão portal é significativamente menor, indicando que o efeito vasoconstritor do etanol no fígado de ratos é mediado predominantemente pela liberação de ET-1 (OSHITA *et al.*, 1993, 1994).

As respostas vasculares hepáticas através da ativação de receptores de endotelina em fígados perfundidos com etanol foram distintas tanto no leito arterial, apresentando vasoconstrição dose-dependente, seguindo as observações concernentes a forma e duração das respostas feitas por FARO *et*

al (1995), quanto portal, e especificamente foi relacionado ao subtipo (ET_B) de receptor envolvido. Tais achados se adaptam aos de MORELAND *et al* (1994), que demonstrou a existência de uma distribuição maior de receptores ET_B em leitos de baixa pressão e ET_A em leitos de alta pressão.

Não se observaram alterações nas respostas do leito arterial e portal quando da utilização de endotelina-1, um agonista com propriedades ET_A/ET_B mistas, em preparações tratadas com etanol. Porém, as respostas do leito portal propiciadas pelo agonista IRL-1620 (ET_B agonista) apresentaram-se reduzidas após perfusão com etanol sendo esta contínua (25mM) ou não contínua (100mM), não sendo alterada suas respostas do leito arterial. Esses resultados sugerem que receptores ET_B , mas não receptores ET_A , são afetados através da perfusão com etanol alterando assim a variação da resistência vascular portal. As diferentes respostas observadas pela administração dos diferentes agonistas de endotelina deve-se a habilidade da endotelina-1 em aumentar resistência vascular portal por uma ativação preferencial sobre receptores ET_A sobre a ativação receptores de ET_B no leito vascular portal do fígado canino. É notável a redução nas resposta induzidas pelos agonistas IRL-1620 (agonista seletivo ET_B), endotelina-3 e sarafotoxina-c (agonistas preferencialmente ET_B) em preparações perfundidas por etanol, seja a administração intra-arterial ou intra-portal.

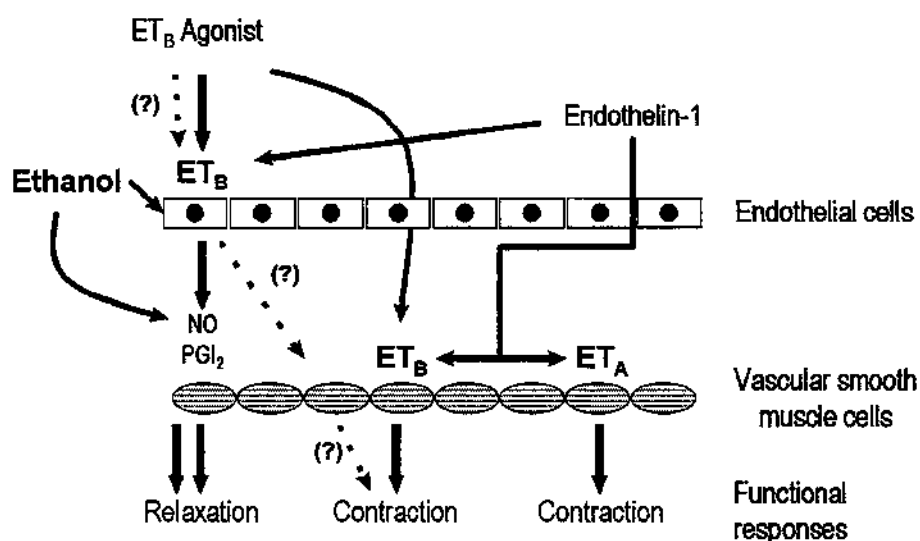


Figura 35 - Diversas ações do etanol na perfusão de fígado canino isolado

A utilização de um agonista independente de receptores endotelina (noradrenalina) se fez necessária. De forma idêntica encontrada por FARO *et al*, (1995) as alterações nos leitos arterial e portal apresentaram-se dependente da dose utilizada e permaneceram inalteradas sugerindo que as mudanças nas resistências vasculares proporcionada por agonistas vasoconstritores independentes de receptores de endotelina não são afetados pela perfusão com etanol nem mesmo quando se administrou através de perfusão constante indometacina e L-NAME.

6 - CONCLUSÕES

- A) A perfusão do fígado canino isolado com etanol reduz a resistência ao fluxo portal, seja na concentração de 100 mM por um período de 30 minutos ou quando a perfusão de etanol é constante na concentração de 25 mM;
- B) A redução da resistência ao fluxo portal no fígado canino isolado perfundido com etanol ocorre pela liberação de óxido nítrico no leito portal;
- C) As respostas vasculares portais induzidas pela ativação dos receptores de endotelina ET_B são reduzidas após perfusão hepática com etanol.
- D) As respostas vasculares portais induzidas pela ativação dos receptores de endotelina ET_B são restauradas nas preparações perfundidas com etanol na ausência do óxido nítrico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDAEL-LAFIT, A .A .& ZHANG, Y. Species differences in effects of endothelin-1 on myo-inositol triphosphate accumulation, cyclic AMP formation and contraction of isolated iris sphincter of rabbit and other mammalian species. **Invest. Ophthal. Vis. Sci.**, 32:2432-8, 1991.
- ALLCOCK, G. H., WARNER, T. D., Inhibition of ET_B receptors limits the efficacy of nonselective endothelin antagonists *in vivo*. **Journal Cardio. Pharmacol**, 26 (suppl 3):S177-S179, 1995.
- 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.
- ARAI, M., LEO, M.A., NAKANO, M.,GORDON, E.R. AND LIEBER, C.S. Biochemical and morphological alterations of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consupcion. **Hepatology**, 4:165-174, 1984b.
- ARTHUR, M.J.; LEE, A.; WRIGHT, R. - Sex differences in the metabolism of ethanol and acetaldehyde in normal subjects. **Gin. Sci.**, 67(4):397-401, 1984.
- BLOCH, D.K., HONG, C.C., EDY, R.L., SHOWS, T.W., QUERTERMOUS, T. CDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene- vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. **Genomics**, 10:236-42, 1991

BOLOTINA, V.M., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., COHEN, R.A .

Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368:850-3, 1994

BOSRON, WF, LUMENG, L. Li , HK. Catalytic properties of human liver

dehydrogenase isoenzymes. **Mol. Aspects Med**; 10:147-158., 1988

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

CABALENA , J. Interactions between alcohol and gastric metabolia

ingenaymes: practical implications **Clin. Flier**:13:511-520, 1991.

CLOZEL, M., GRAY, G.A., BREU, W., LOFFLER, B.-M & OSTER-WALDER, R.

The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 186:867-73, 1992

COLE-HARDING, S.; WILSON, J.R. - Ethanol metabolism in men and women.

J. Stud. Alcohol., 48(4):380-387, 1987.

CRABB. OW, BOSRON WF. Li TK. Ethanol metabolism. **Pharmacol**

Ther;34:59-73., 1987

D'ORLEANS-JUSTE, P., LIDBURY, P.S., WARNER, T.D., VANE, J.R.

Intravascular big endothelin increases circulation levels of endothelin-1 and proaglandins in the rabbit. **Biochem. Pharmacol.**, 38:R21-2, 1990.

DAVENPORT, A .P. & MAGUIRRE, J.J. Is endothelin-induced vasoconstriction

mediated only by ET_A receptors in humans? **TIPS**, 15, 9-11, 1994.

- DE NUCCI, G., GRYGLEWSKI, R.G., WARNER, T.D. & VANE, J.R.. The receptor-mediated release of EDRF and PGI_2 from bovine aortic endothelial cells is coupled. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85:2334-2338, 1988b.
- 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. USA**, 85:9797-9800, 1988a.
- DIPADOVA, C, ROME R, FREZZA, M, GENTRY, RT, BARAONA, F, LIEBER, CS. Effects of ranitidine on blood alcohol levels after ethanol in gestion. Comparison with other H2-receptor antagonists. **JAMA**, 267:83 86, 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**, 263:261-264, 1990.
- EMOTO, N., YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. **J. Biol. Chem.**, 270:15256-68, 1995.
- FARO, R.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; DONATO, J. L.; BOIN, I.; OPGENNORTH, 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 - s 208, 1995.

- FORESTERMANN, U.; NAKANE, M.; TRACEY, WR.; POLLOCK, JS. Isoforms of nitric oxide synthase: Functions in the cardiovascular system. *Eur. Heart J.*, 14 (Suppl. I): 10-15, 1993
- FORTES, Z.B., HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. Endothelium-derived vasoactive factors in the microcirculation: responsiveness to nitric oxide and endothelin in normal and diabetic states. *Immunopharmacology of the microcirculation. Ed Sue Brain, Academic Press Limited, London*, pp:25-62, 1994.
- FREEZA, M, DiPADOVA, C. POZZATO, B. TERPIN, M, BARAONA F. LIEBER CS. High blood alcohol levels in omen. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J. Med.*:322:95-99 1990.
- FURCHGOTT RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 53:557-573, 1983.
- 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.
- GANDHI, C.R., STENPHESON, K., OLSON, M.S. Endothelin, a potent peptide agonist in liver. *J. Biol. Chem.*, 265:17432-35, 1990.
- GANDHI, VC., ROSS DH. Effects of alcohol on alpha-adrenergic receptor regulation of calcium ATPase in liver plasma membranes. *Alcohol*, 4:25-30, 1987.

- GODFRAIND, T. Evidence for heterogeneity of endothelin receptor distribution in human coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**, 110:1201-1205, 1993.
- GOLDSTEIN, DB., CHIN, JH. Interaction of ethanol with biological membranes. **Fed. Proc.**, 40: 140-151, 1981
- GORMAN, R. R.; BUNTING, S.; MILLER, O. V. - Modulation human platelet adenylate ciclase by prostacyclin (PGX). **Prostaglandins**, 13:377-88, 1977.
- GOTO, K., KASUYA, Y., MATSUKI, N., TAKUWA, Y., KIRIHARA, H., ISHIKAWA, T., KIMURA, S., YANAGISAWA, M., MASAKI, T. Endothelin actives the dihydropyrimidine-sensitive, voltage-dependent calcium channel in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , 86:3915-8, 1989.
- GRASSI-KASSISSE, D.M., ANTUNES, E., WITHRINGTON, P.G. & DE NUCCI, G. Involvement of nitric oxide in the canine splenic microcirculation and smooth muscle capsule. **Naunyn Schimiedeberg's Archives of Pharmacology**, submitted, 1994b.
- GRASSI-KASSISSE, D.M., ANTUNES, 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, 1994a.
- GRASSI-KASSISSE, D.M., FARO, R., WITHRINGTON, P.G., ZATZ, R., OPGENORTH, T.J., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. Characterisation of funcional endothelin receptors in the canine isolated perfused splenn. **Eu. J. Pharmacology**, 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 RJ, BOTTING RM, VANE JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 12:530-548, 1988
- GRYGLEWSKI, R.J., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 320:454-6, 1986.
- GUYTON, TAYLOR AND GRANDER. Circulatory Physiology II. Dynamics and control of the body fluids, **W.B. Sanders. Philadelphia**, 1975
- HALL, M.P., PLUMMER, J.L., ILSLEY, A.H. AND COUSINS, M.J. Hepatic fibrosis and cirrhosis after chronic administration of alcohol and low-dose carbon tetrachloride vapor in the rat. *Hepatology*, 13:815-819, 1991.
- HANDLER, JA, THURMAN, RG. Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *J Biol Chem.*, 265: 1510-1515, 1990.

- HARRISON, V., RANDRIATSOA, A. & SCHOEFTER, P. Heterogeneity of endothelin-sarafotoxin receptors mediating contraction of pig coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**, 105:511-513, 1992.
- HARTLEB, M., MOREAU, R., CAILMAIL, S., GAUDIN, C., LEBREC, D. Vascular Hyporesponsiveness to Endothelin 1 in Rats With Cirrhosis. **Gastroenterology**, 107:1085-1093, 1994.
- HICKEY, K. A. ; RUBANYI, G.M.; PAUL, R.J. and Highsmith, R.F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, 248:C550-6, 1985.
- HIJIOKA T., SATO N., MASUMURA T., YOSHIHARA H., TAKEI Y., FUKUI H., OSHITA M., KUWANO S., AND KAMADA T. Ethanol-induced disturbance of hepatic hypoxia. **Biochem. Pharmacol.** 41:1551-1557, 1991.
- HOLZMAN, S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, 8:409-19, 1982.
- HU, S., KIM, H.S., JENG, A.Y. Dual action of endothelin-1 on the Ca^{2+} -activated K^+ channel in smooth muscle cells of porcine coronary artery. **Eur. J. Pharmacol.**, 194:31-6, 1991.
- HUGGINS, J.P., PELTON, J.T., MILLER, R.C. The structure and specificity of endothelin receptor: the importance in physiology and medicine. **Pharmacol. Ther.**, 59:55-123, 1993.

- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. Prostaglandin biosynthesis in the microcirculation: regulation by endothelial and non-endothelial factors. **Prost. Leuk. and Essential Fatty Acids**, 49:723-760, 1993.
- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. **Pharmacological Research Communications**, 26:223-242, 1992.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRONS, R.E. CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 84:9265-9, 1987.
- INOUE, A; 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.
- ITO, T. T.; OGAWA, K.; ENOMOTO, J.; HASHIMOTO, H.; KAI, J.; SATAKE, T. - Comparisson of effects of PGI₂ and PGE₁ on coronary systemic haemodinamics and on coronary arterial cyclic nucleotide levels in dogs. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.**, 7:641-6, 1980.
- KARNE, S., JAYAWICKREME, C. K., LERNER, M.R. Cloning and characterization of are endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophorus. **J. Biol. Chem.** 268:19126-33, 1993
- KASUYA, Y., ISHIKAWA, T., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., GOTO, K., MASAKI, T. Mechanism of contration to endothelin in isolated porcine coronary artery. **Am. J. Physiol.**, 257:H1828-35, 1989.

- KIMURA, S., KASUYA, Y., SAWAMURA, T., SHINMI, O., SUGITA, Y., YANAGISAWA, M., GOTO, K., MASAKI, T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationship of big endothelin-1. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13 (suppl. 5):S5-7, 1989.
- KLEINFELD, AM., DRAGESTEN, P. KAUSNER, RD., PRUPPRA, WJ. Matayoshi ED. The lack of relationship between fluorescence polarization and lateral diffusion in biological membranes. **Biochim Biophys Acta**, 649:471-480, 1981.
- KLOOG, Y., SOKOLOVSKY, M. Similarities in mode and sites of actions of sarafotoxins and endothelins. **Trends Pharmacol. Sciences**, 10:212-214, 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.
- LIEBER, CS. Interactions of alcohol and other drugs and nutrients: Implications for the therapy of alcoholic liver disease. **Drugs**, 40:23-44, 1990.
- LIEBER, CS. Metabolism and metabolic effects of alcohol. **Med Clin North Am**;68:3-31, 1984.
- LIEBER, C.S., BARAONA, E., HERNANDEZMUNOZ, R., KUBOTA, S., SATO, N., KAWANO, S., MATSUMURA, T. AND INATOMI, N. Impaired oxygen

utilization. A new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. **J. Clin. Invest.** 83:1682-1690, 1989.

LINCOLN, T.M. & CORNWELL, T.L. Intracellular cyclic GMP receptors proteins. **FASEB J.**, 7:328-38, 1993.

LINCOLN, T.M. & CORNWELL, T.L. Towards and understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. **Blood Vessels**, 28:129-37, 1991.

MADDREY, WC. Hepatic effects of acetaminophen. Enhanced toxicity in alcoholics. **J Clin Gastroenterol**; 9: 180-185, 1987.

MARLETTA, M.A., YOON, P.S., IYENGAR, R., LEAF, C.D., WISNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, 27:8706-11, 1988.

MARTIN, W., VILLANI, G.M., DESINGARO, J., FURCHGOTT, R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** , 232:708-16, 1985.

MASAKI, T., KIMURA, S., YANAGISAWA, M. GOTO, K. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. **Circulation**, 84:1457-68, 1991.

MASSUDA, E., KAWANO, S., NAGANO, TSUJI. S., TAKEI, Y., HAYASHI, N., TSUJII, M., OSHITA, M., MICHIDA, T., KOBAYASHI, I., PENG, H., FUSAMOTO, H., KAMADA, T., Role of endogenous endothelin in

- pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Am. J. Physiology**, 265:(Gastrointest. Liver Physiology 28:G474-G481, 1993
- MISHIRA, L.; SHARMA, S.; POTTER, J.J.; MEZEY, B. More rapid elimination of alcohol in women as compared to their male siblings. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 3(6):752-754, 1989.
- 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., PALMER, R.M.J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: **Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. Pharmacol. Rev.**, 43:109-42, 1991.
- 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.
- MOORE, P.K.; AL-SAWAYEH, O.A.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.A.; GIBSON, A. L-N^G-Nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine reversible inhibitor of endothelium - dependent vasodilatation "*in vitro*". **Br. Pharmacol.**, 99:408 - 12, 1990.
- MORELAND, S.; MCMULLEN, 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.

- MORELAND. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET_B-like receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 184:100-106, 1992.
- MULSCH, A. & BUSSE, R. - NG -nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino) methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 341:143-7, 1990.
- MURRAY, K. J. - Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. **Pharmacol. Ther.** 47: 329 – 45, 1990.
- MURRY, J.J., FRIDOVICH, I., MAKHOUL, R.G., HAGEN, P.O. Stabilization and partial characterization of endothelium-derived relaxing factor from cultured aortic endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 141:689-96, 1986.
- NORSTEN, C, CRONHOLM, T, EKSTRORN, U , HANDLER, JÁ , THURMAN, RU, INGELMAN-SUNDBERG, M. Dehydrogenase-dependent ethanol metabolism in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) lacking cytosolic alcohol dehydrogenase. Reversibility and isotope effects *in vivo* and in subcellular fractions. **J Biol Chem**; 264:5593- 5597., 1989
- O'BRIAN, K.P., ROBBINS, R.J., MCMURTRY, L.F. Endothelial cells in culture produce a vasoconstriction substance. **J. Cell. Physiol. Exp. Ther.**, 252:1318-23, 1990.
- OHLSTEIN, E.H., BECK, G, DOUGLAS, S.A. NAMBI, P., GLEASON, J.G., RUFFOLO, R.R.,JR., FEUERSTEIN, G.Z. & ELLIOTT, J.D. Non-peptide

endothelin receptor antagonists. II: Pharmacological characterization of SB-209670. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 271:762-768, 1994.

OKAMURA, T., MATSUMOTO, T., IKEMOTO, F. & TODA, N. Mechanisms of the biphasic responses to endothelin-3 in dog coronary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, 107:1037-1041, 1992.

OSHITA, M. TAKEI, Y. KAWANO, S. HIJIOKA, T. MASUDA, E. GOTO, M. NISHIMURA, Y. NAGAI, H. ITO, S. TSUJI, S. FUSAMOTO, H. KAMABA, T. Endogenous nitric oxide attenuates ethanol-induced perturbation of hepatic circulation in isolated perfused rat liver. **Hepatology**, 20:961-965, 1994.

OSHITA, M., TAKEI, Y., SUNAO K., HURUMASA Y., TAIZO H., HIROYUKI F., MORITAGA G., EIJI M., YOSHIYA N., HIDEYUKI F. AND TAKENOBU K. Roles of Endothelin-1 and Nitric Oxide in the mechanism for Ethanol-induced vasoconstriction in rat liver. **J. Clin. Invest.**, 91:1337-1342, 1993.

PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327:524-526, 1987.

PALMER, R.M.J., D.D. REES, D.S. ASHTON AND S. MONCADA. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 153:1251-1256, 1988b.

- PALMER, R.M.J., D.D. REES, D.S. ASHTON AND S. MONCADA. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333:664-6, 1988a.
- PEQIJIGNOT, G.; TUYNS, A.D.; BERTA, J.L. - Ascitic cirrhosis in relation to alcohol consumption. **Int. J. Epidemiol.**, 7(2):1 13-120, 1978.
- PETROS, A; LAMB, G; LEONE, A ; MONCADA, S; BENNET, D; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovas. Res.**, 28: 34-9, 1994
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxin factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br. J. Pharmacol.**, 92:181-7, 1987a.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, 2:1057-8, 1987b.
- RAE, G.A., TRYBULEC, M., DE NUCCI, G. & VANE J.R. Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13;S89-92, 1989.
- RAPPOPORT, R.M. & MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediate through cGMP. **Circ. Res.**, 52:352-7, 1983.

- REES, D.D., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86:3375-8, 1989.
- RICHARDSON, P.D.I & WITHRINGTON, P.G. Alpha and beta adrenoceptors in the hepatic portal venous vascular bed of the dog. **Br. J. Pharmacol.**, 62:376-377, 1978.
- RIEDER, H., RAMADORI, G., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H. (1991). 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.
- 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. **Hepatol.**, 24:233-40, 1996.
- ROME, R, GENTRY, RT, HERNANDEZ-MUNOZ, R, BIARAONA, E, LIEBER, CS Aspirin increases blood alcohol concentrations in humans after ingestion of ethanol. **JAMA**, 264:2406-2408 1990.
- 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.
- RUBANYI, G. M., POLOKOFF, M. A. Endothelins: Molecular, Biology, Biochemistry, Pharmacology, Physiology and Pathophysiology. **Pharmacol. Reviews**, 46:325-415, 1994.

- RUBIN, M. AND LIEBER, C.S. Fatty liver, alcoholic-hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates . **New Engl. J. Med.**, 290:128-135, 1967.
- SAIDA, K., MITSUI, Y., ISHIDA, N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. **J. Biol. Chem.**, 264:14613-6, 1989.
- 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, 1992.
- SCHMIDT, H.W., WITTFOHT, N.H., GERLACH, J., PRESCHER, K.E, KLEIN, M.M., NIROOMAND, F. Arginine is the physiological precursor of endothelium derived nitric oxide . **Eur. J. Pharmacol.**, 154:213-6, 1988.
- SERRADEIL LE GAL, C., JOUNEAUX, C., SANCHEZ BUENO, A ., RAUFAST, D., ROCHE, B., PREAUX, A .M., MAFFAND, J.P., COBBOLD, P. H., HANOUNE, J., LOTERSZTAJN, S. Endothelin action in rat liver. Receptor free Ca^{2+} oscillation, and activation of glycogenolysis. **J. Clin. Invest.**, 87:133-8, 1991.
- SHERLOCK, S. Diseases of the liver and biliary sistem. **Blackweel Scientific Publications**. 8^a edition . pag. 425-48, 1989.
- SHIMADA, K., TAKAHASSHI, M., TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, 269:18725-8, 1994.

- SISSON/GROSMANN . Anatomia dos Animais Domésticos , **Interamerica**, 5ª edição, 1460-3; 1984
- SNEDDON, J.M. & VANE J.R. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelium cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85:2800-4, 1988.
- SNELL, R. S. Histologia clínica. Rio de Janeiro: **Interamericana**,. p. 394. 1985
- SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C.; THIERMERMANN, C. Isothioureas potent inhibitor of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 510-6, 1995.
- STEWART, D.J., KUBAC, G., COSTELLO, K.B., CERNACEK, P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, 18:38-43, 1991.
- SUMNER, M.J., CANNON, T.R., MUNDIN, J.W., WHITE, D.G. & WATTS, I.S. Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth muscle contraction. **Br. J. Pharmacol.**, 107:858-860, 1992.
- TAKAI, M., UMEMURA, I., YAMASAKI, K. WATAKABE, T., FUJITANI, Y., ODA, K., URADE, Y., INIU, T., YAMAMURA, T. & OKADA, T. A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 184:953-959, 1992.
- 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.
- TAKASAKI, C., TAMIYA, N., BDOLAH, A. ., WOLLBERG, Z., KOCHVA, E. Sarafotoxin S6: several isotoxin from *Atractapis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. **Toxicon**, 26:543-8, 1988.
- TATESON, J. E.; MONCADA, S.; VANE, J. R. - Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentration in human platelets. **Prostaglandins**, 13:389-97, 1977.
- TAYLOR, R.N., VARMA, M., TENG, N.N.H., ROBERTS, J.M. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. **J. Clin. Endocr. Metab.**, 71:1675-7, 1990.
- THAN THI, T.A. ., KAWADA, N., DECKER, K. Regulation of endothelin-1 action on the perfused rat liver. **FEBS Lett.**, 318:353-7, 1993.
- WARNER, T.D., ALLCOCK, G.H., CORDER, R. & VANE, J.R. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. **Br. J. Pharmacol.**, 110:777-782, 1993a.
- WARNER, T.D., ALLCOCK, G.H., CORDER, R., MICKLEY, E.J. & VANE, J.R. Comparative studies the endothelins receptors antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors. **J. Cardiol. Pharmacol**, 22 (suppl 8):S117-S119, 1993b.

- 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, 1989.
- 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, 1989.
- WARNER, T.D., SCHMIDT HHHW., MURAD, F. Interaction of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells. Selective effect of endothelin-3. **Am. J. Physiol.**, 262:H 1600-05, 1992.
- WITHRINGTON, P.G., ANSARI, N., CROXTON, R., DE NUCCI, G. & VANE, J.R. The action of endothelins-1 and -3 on the vascular and capsular smooth muscle of the isolated blood perfused spleen of the dog. **Br. J. Pharmacol.**, 105:490-494, 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.
- WOLF-HEIDEGGER, G., Atlas de Anatomia Humana, **Guanabara Koogan**, 4ª edição, 68-69, 1981
- XU, D., EMOTO, N., GIADI, ^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**, 323:411-415, 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.
- ZYSSET, T . POLOKOFF , MA, SIMON, FR Effect of chronic ethanol administration on enzyme and lipid properties on liver plasma membranes in long and short sleep mice. **Hepatology**,:5.531-537. 1985

8 - APÊNDICE

Ethanol Reduces the Endothelin-B Receptor-Mediated Increase in Portal Inflow Resistance in the Isolated, Perfused Canine Liver

Flávio Faro, José Geraldo P. Ferraz, Heryck J. Stella, Renato Faro, Edson Antunes,
*Terry J. Opgenorth, †Peter G. Withrington, and ‡Gilberto de Nucci

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil;

*Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, U.S.A.; †Queen Mary and Westfield College, London, England; and ‡Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Summary: Ethanol can affect the regulation of liver hemodynamics through the release of vasoactive mediators such as nitric oxide and endothelins (ETs). The purpose of this study was to investigate the effects of ethanol on the changes in arterial and portal perfusion pressure induced by ET receptor activation. Ethanol significantly reduced portal, but not arterial perfusion pressure. ET-1 and norepinephrine (used as an ET receptor-independent vasoconstrictor) induced changes in hepatic arterial or portal inflow resistance that were not affected

by ethanol treatment. However, an IRL 1620-induced increase in portal, but not arterial, inflow resistance was significantly reduced in ethanol-perfused preparations, an effect observed after either intra-arterial or intraportal administration of the agonist. These results suggest that ethanol can diminish the responsiveness of the portal vascular bed of the canine liver to ET_B receptor activation. **Key Words:** Ethanol—Liver blood flow—Endothelin receptors.

Ethanol is widely consumed by humans and can lead to severe liver injury (1). Moreover, ethanol can potentially affect the regulation of liver hemodynamics (2). Endothelin-1 (ET-1) increases canine hepatic arterial vascular tone through activation of ET_A receptors (3), whereas in the portal vascular bed ET-1 acts via both ET_A and ET_B receptors (Ferraz et al., unpublished observation) (4). Release of vasoactive mediators, including ET-1 and nitric oxide (NO), after liver perfusion with ethanol has been reported in rats (2,3). Therefore, the aims of this study were twofold: to investigate the effects of ethanol on the arterial and portal perfusion pressure of the canine liver, and to assess the effects of ethanol on the responsiveness of the hepatic vasculature to selective ET_A/ET_B receptor activation.

MATERIALS AND METHODS

Hepatectomy was performed on mongrel dogs ($n = 5$, both sexes) as previously described (5). The hepatic artery and the portal vein were cannulated and connected to the perfusion system. The liver was perfused with warmed (37°C), oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution by a peristaltic pump, adjusted to provide basal hepatic arterial (HAPP) and portal (HPPP) perfusion pressures of 20–40 mm Hg and 2–4 mm Hg, respectively. HAPP and HPPP were recorded continuously throughout the experiments using pressure transducers (Ugo Basile, Italy) connected to the perfusion system and a two-

channel pen recorder (Ugo Basile). Arterial and portal inflow vascular resistance (HAVR and HPVR, respectively) were calculated as HAPP or HPPP (mm Hg) divided by the arterial or portal inflow (ml/min), and expressed as mm Hg/min/ml. The preparation was allowed to equilibrate for approximately 30 min. Changes in HAVR and HPVR after a single intra-arterial or intraportal bolus injection of ET-1 (40 and 100 pmol) or the selective ET_B receptor agonist IRL 1620 (100–1,000 pmol) were evaluated before and after 30-min perfusion of the preparation with 100 mM ethanol. Norepinephrine (NE, 5–50 nmol) was used as a control ET receptor-independent agonist.

Drugs

ET-1, IRL 1620, and NE were obtained from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). All drugs were dissolved in Krebs solution (composition in mM: NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.17, CaCl₂ 2.5, and glucose 5.6). Ethanol was obtained from Grupo Química (São Paulo, Brazil).

Statistics

The results are presented as the mean $\pm$ SEM. Comparison of means was made using Student's paired t test or one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls post hoc test where appropriate. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Under basal (control) conditions, the mean hepatic arterial vascular resistance (HAVR) was 1.87 ± 0.24 mm

TABLE 1. Hepatic arterial vascular responses to intra-arterial administration of endothelin-1 (ET-1), IRL 1620, and norepinephrine (NE)

	ET-1 (pmol)		IRL 1620 (pmol)			NE (nmol)		
	40	100	100	400	1,000	5	15	50
Control	0.5 ± 0.4	1.1 ± 0.6	0 ± 0	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.4 ± 0.3	1.2 ± 0.5	2.5 ± 0.8
Ethanol	0.2 ± 0.1	1.5 ± 1.1	0 ± 0	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.04	1.0 ± 0.6	1.9 ± 1.2	3.5 ± 1.5

Results are expressed as changes in arterial vascular inflow resistance (mm Hg/ml/min) before and after perfusion of both circuits of the preparation with 100 mM ethanol.

TABLE 2. Hepatic arterial vascular responses to intraportal administration of endothelin-1 (ET-1), IRL 1620 and norepinephrine (NE)

	ET-1 (pmol)		IRL 1620 (pmol)			NE (nmol)		
	40	100	100	400	1,000	5	15	50
Control	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.06 ± 0.06	0.06 ± 0.06	0.09 ± 0.06	0 ± 0	0 ± 0	0.02 ± 0.018
Ethanol	0 ± 0	0.03 ± 0.03	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0.03	0 ± 0.01	0.07 ± 0.05

Results are expressed as changes in arterial vascular inflow resistance (mm Hg/ml/min) before and after perfusion of both circuits of the preparation with 100 mM ethanol.

TABLE 3. Hepatic portal vascular responses to intraportal administration of endothelin-1 (ET-1) and norepinephrine (NE)

	ET-1 (pmol)		NE (nmol)		
	40	100	5	15	50
Control	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.04
Ethanol	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.03

Results are expressed as changes in portal vascular inflow resistance (mm Hg/ml/min) before and after perfusion of both circuits of the preparation with 100 mM ethanol.

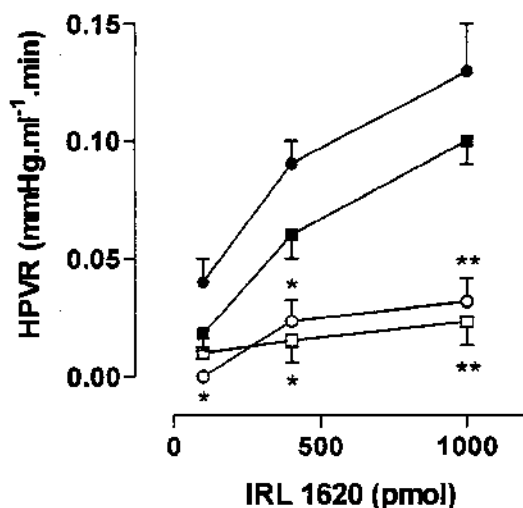


FIG. 1. Hepatic portal vascular responses to ET_B receptor activation before (solid symbols) and after (open symbols) 100 mM ethanol perfusion in the canine liver, as measured by changes in portal inflow resistance (HPVR). Both intra-arterial (squares) and intraportal (circles) administration of IRL 1620 produced a dose-dependent increase in HPVR. However, treatment with ethanol significantly reduced the portal vascular responses to IRL 1620. Asterisks denote significant differences compared to the respective controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Hg/ml/min and the mean hepatic portal vascular resistance (HPVR) was 0.22 ± 0.03 mm Hg/ml/min. Perfusion of the preparation with 100 mM ethanol significantly reduced portal (0.15 ± 0.02 mm Hg/ml/min; $p < 0.01$) but not hepatic arterial (1.89 ± 0.17 mm Hg/ml/min) vascular resistance.

Hepatic arterial vascular responses to intra-arterial administration of ET-1, IRL 1620, or NE were not affected by liver perfusion with ethanol (Table 1). Similarly, ethanol infusion did not affect the hepatic arterial vascular responses induced by intraportal injection of ET-1 and NE (Table 2). However, ethanol infusion abolished hepatic arterial vascular responses induced by intraportal administration of IRL 1620 (Table 2). Portal vascular responses to intraportal injection of ET-1 or NE were not modified by ethanol treatment (Table 3), and similar results were observed after intra-arterial administration of the agonists (data not shown). However, IRL 1620-induced changes in portal inflow resistance were significantly reduced in ethanol-perfused livers, an effect observed after either intra-arterial or intraportal administration of the selective ET_B agonist (Fig. 1).

DISCUSSION

Our results demonstrate that hepatic vascular responses to ET receptor activation after ethanol perfu-

sion were distinct in the arterial and portal circuits and were specifically related to the receptor subtype involved. There were no changes in the arterial or portal responses to ET-1, an ET receptor agonist with mixed ET_A/ET_B properties, in preparations treated with ethanol. However, IRL 1620-induced portal, but not arterial, responses were significantly reduced after treatment with ethanol. These results suggest that the ET_B - but not ET_A -mediated increase in portal vascular resistance is affected by ethanol. The differential responses observed with both ET receptor agonists are related to the ability of ET-1 to augment portal inflow resistance through a preferential activation of ET_A over ET_B receptors in the portal vascular bed of the canine liver (Ferraz et al., unpublished observation). It is noteworthy that the reductions in IRL 1620-induced responses in ethanol-perfused preparations were obtained after either intra-arterial or intraportal administration of the selective ET_B receptor agonist, further confirming the effects of ethanol on ET_B -mediated events. NE-induced changes in hepatic arterial and portal vascular resistance were unaltered, suggesting that ET-independent vasoconstriction is not affected by ethanol.

In conclusion, our results indicate that ethanol can potentially reduce ET_B -mediated vascular responses in the canine liver and therefore alter the regulation of liver

hemodynamics. Whether the reduction induced by ethanol perfusion in the portal perfusion pressure of the canine liver reflects endogenous activation of the ET_B receptor remains to be investigated.

Acknowledgments: F. F., H. J. S., and R. F. were supported by studentships 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. This work was supported by a grant to G. de N. from FAPESP.

REFERENCES

1. Cloninger CR, Dinwiddie SH, Reich T. Epidemiology and genetics of alcoholism. *Annu Rev Psychiatry* 1989;8:331-46.
2. Oshita M, Takei Y, Sunao K, et al. Roles of endothelin-1 and nitric oxide in the mechanism for ethanol-induced vasoconstriction in rat liver. *J Clin Invest* 1993;91:1337-42.
3. Oshita M, Takei Y, Kawano S, et al. Endogenous nitric oxide attenuates ethanol-induced perturbation of hepatic circulation in isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1994;20:961-5.
4. Zhang BM, Calmus Y, Wen LL, et al. Endothelin-1 induces liver vasoconstriction through both ET_A and ET_B receptors. *J Hepatol* 1997;26:1104-10.
5. Faro R, Grassi-Kassisse DM, Donato JL, et al. Role of endothelin ET_A and ET_B receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26(suppl 3):S204.

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

Dr. G. De Nucci
Dept. of Pharmacol.
Facult. of Med. Sciences
UNICAMP
P.O. Box 6911
13061-970 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: Ferraz, J.G.P., H.J. Stella, F. Faro, R. Faro, E. Antunes, P.G. Withrington, T.J. Oppenorth, 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-1-induced portal vascular responses are mediated
predominantly by endothelin ET_A receptor activation**

*José Geraldo P. Ferraz^{1,2}, Heryck J. Stella¹, Flávio Faro¹, Renato Faro¹, Edson
Antunes¹, Peter G. Witherington³, Terry J. Opgenorth⁴, and Gilberto de Nucci⁵*

Department of ¹Pharmacology and ²GI Research Lab - Gastrocentro, Department
of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil;

³Queen Mary & Westfield College, Mile End Rd., London, U.K.; ⁴Abbott
Laboratories, Chicago, U.S.A.; and ⁵Department of Pharmacology, Institute of
Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding Author: Jose Geraldo P Ferraz M.D., Ph.D.

GI Research Lab – Gastrocentro

Faculty of Medical Sciences

University of Campinas - UNICAMP

Rua Coronel Quirino 1425 - 111

13025-002 Campinas, São Paulo, Brazil

Phone: (55) (19) 251 9113; FAX: (55) (19) 255 8334

E-mail: jgferraz@so.dglnet.com.br

Abstract

Endothelins are endothelial-derived vasoactive mediators with potent effects in many vascular territories through activation of endothelin ET_A and ET_B receptors. In this study, we characterized the endothelin receptor population in the hepatic portal circulation using selective agonists and antagonists. In the isolated perfused canine liver, intraportal injection of both endothelin-1 (40-400 pmol) and IRL 1620 (100-1000 pmol) elevated portal vascular resistance in a dose-dependent fashion; they were equipotent in their effects, despite portal responses to endothelin-1 being prolonged compared to IRL 1620. Endothelin-1 and IRL 1620 caused significant elevations in portal vascular resistance also when injected into the hepatic artery. Endothelin-1- or IRL 1620-induced increase in portal vascular resistance was significantly antagonized by treatment with FR 139317 (0.3 μ M) and BQ-788 (0.3 μ M), respectively. In addition, endothelin-1-, but not IRL 1620-mediated vascular effects were augmented in preparations treated with N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 μ M) and indomethacin (5.6 μ M). We conclude that the canine hepatic portal bed has a mixed population of endothelin ET_A and ET_B receptors which, when activated, both elicit portal vasoconstriction. In addition, only the portal endothelin ET_A receptor-mediated response was potentiated by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition. These observations may reflect a different population of cell types accessible from the hepatic portal inflow compared to the arterial inflow.

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

1. Introduction

Endothelin-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 endothelin-1 produces marked, long-lasting, vasoconstrictor responses in most vascular territories, effects mediated by activation of both endothelin 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 endothelin ET_B receptor stimulation (Warner et al., 1993). Therefore, the vascular responses to endothelin-1 are determined by the relative distribution of endothelin receptor subtypes present at any particular vascular site. Clearly, it is important to characterize endothelin 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 endothelin-1-induced vascular responses of the two canine hepatic inflow circuits, portal and arterial, and subsequently (Faro et al., 1995), using selective endothelin ET_A and ET_B receptor agonists and antagonists, have demonstrated the predominant endothelin 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

endothelin receptor population of the canine hepatic portal vascular bed using selective pharmacological probes, such as endothelin ET_A and ET_B receptor agonists and antagonists. The results reveal a different endothelin 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 (Zhang et al., 1997) and rabbit liver (Wang 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.

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 endothelin receptors to indicate the contribution of these vasoactive mediators to the control of hepatic portal inflow resistance by endothelin.

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 (Faro et al., 1995). 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 and portal 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 was calculated as the portal

perfusion pressure (mmHg) divided by portal vein inflow (ml/min). Changes in portal inflow resistance following administration of test agonists were 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 was used as an endothelin receptor-independent vasoconstrictor, whilst both endothelin-1, endothelin-3 (endothelin ET_A/ET_B receptor agonists) and IRL 1620 (selective endothelin ET_B receptor agonist) were used to determine the endothelin receptor population in the portal vascular bed, and the consequences of their activation. Noradrenaline (5-50 nmol), endothelin-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 the portal inflow resistance was calculated. At least five experiments were performed for each agonist, and dose-response curves were constructed. A higher concentration of each agonist was used following the return of the perfusion pressure to levels found on baseline. Since the duration of endothelin-1-induced increase in portal perfusion pressure was prolonged, only two agonists were tested in each experiment (noradrenaline followed by endothelin-1 or IRL 1620). To assess changes in portal vascular resistance to elevated arterial levels of endothelin agonists, endothelin-1, endothelin-3, IRL 1620 and noradrenaline were administered into the hepatic artery alone, and

changes in both hepatic arterial vascular resistance and portal vascular resistance evaluated.

The reproducibility of the portal vascular responses to endothelin receptor agonists over time was tested performing repeated intra-portal administration of endothelin-1 and IRL 1620. Three sets of dose-response curves were constructed, each one consisting of administration of endothelin-1 (40-400 pmol) followed by administration of IRL 1620 (100-1000 pmol). The agonists were administered in increasing concentrations as described above. The duration of each experiment (approximately 8 h) was estimated to be similar to the experiments using endothelin receptor antagonists described below. Five experiments were performed, with a total of three sets of dose-response curves to both agonists in each preparation. The effects of repeated intra-arterial administration of IRL 1620 (100-1000 pmol) on portal inflow resistance was also investigated in order to assess if elevated arterial levels of endothelin ET_B agonists were indeed capable of increasing portal inflow resistance.

2.2.2 Endothelin antagonists. Control portal vascular responses to the agonists noradrenaline, endothelin-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 endothelin ET_A or ET_B receptor antagonists (FR 139317 and BQ-788, respectively). Subsequently, the alternative receptor antagonist was added to the portal perfusion circuit to produce concomitant endothelin 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.

The responsiveness of the preparation at the end of each experiment was tested by intra-portal administration of noradrenaline (50 nmol) followed by administration of endothelin-1 (40 pmol) or IRL 1620 (400 pmol) in the absence of both antagonists.

2.2.3. Prostaglandin and nitric oxide synthesis inhibitors. The role of prostaglandins and nitric oxide (NO) on the vascular responses produced by administration of the three agonists, noradrenaline, endothelin-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 μM) was added initially, and the dose-response curves to the agonists obtained 15 minutes later. L-NAME (10 μM) 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, endothelin-3, 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 (L-NAME and/or indomethacin, and endothelin receptor antagonists), or bolus injection directly into the portal inflow line (endothelin receptor agonists and noradrenaline). 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 $\pm$ S.E.M. Comparison of means were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls post test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1.1 Portal vascular responses to intraportal endothelin-1, IRL 1620 and noradrenaline.

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 resistance of 10 is similar to that reported previously in the dog (Richardson and Withrington, 1978).

Intraportal administration of noradrenaline (5-50 nmol), endothelin-1 (40 - 400 pmol) and IRL 1620 (100-1000 pmol) resulted in dose-dependent increases in portal perfusion pressure (Fig. 1). The time course of the portal responses of the three agonists was different, the responses to endothelin-1 being long-lasting relative to the responses to noradrenaline and IRL 1620 (Fig. 1). Typically, the duration of responses to the higher dose (400 pmol) of endothelin-1 was 60 min, while IRL 1620-induced responses (1000 pmol) lasted approximately 30 min. At constant portal inflow, these changes in portal pressure reflect an increase in portal inflow resistance. Over the molar dose range investigated, the two agonists, endothelin-1 and IRL 1620, were equipotent in elevating hepatic portal vascular resistance (Fig. 2).

3.1.2 Portal responses to intra-arterial administration of endothelin-1, endothelin-3 and IRL 1620.

All three agonists increased hepatic arterial inflow resistance and, in addition, caused simultaneous increases in portal vascular resistance (Fig. 3). Differential changes in the hepatic inflow vascular resistance were particularly

marked for the intra-arterial administration of the selective endothelin ET_B receptor agonist, IRL 1620, and the predominant endothelin ET_B receptor agonist, endothelin-3, since substantial increases in portal vascular resistance occurred accompanied by very small changes in the arterial circuit, reflecting the different endothelin receptor profile of the two hepatic inflow channels.

3.1.3 Portal responses to repeated administration of endothelin receptor agonists. Repeated intraportal administration of both endothelin-1 and IRL 1620 produced a reproducible increase in portal inflow resistance over time (Table 1). The mean duration of each experiment was approximately 8 hours and endothelin-1- and IRL 1620-induced augmentation of portal inflow resistance was preserved, indicating that the preparation was indeed capable of responding to specific endothelin receptor activation at the end of the experiment. Moreover, the portal vascular responses to endothelin ET_B receptor activation was not affected by repeated intra-arterial administration of IRL 1620, further suggesting that the responsiveness of the preparation to the agonists was maintained (Table 1).

3.2 Effects of selective endothelin receptor antagonists. Portal vasoconstrictor responses to intraportal injection of endothelin-1, IRL 1620 and noradrenaline were determined before and during the intraportal infusion of the selective endothelin ET_A receptor antagonist, FR 139317 (0.3 μ M), and/or the selective endothelin 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 endothelin-1 were significantly reduced during the infusion of FR 139317 (Fig.

4a). Addition of BQ-788 to the perfusion solution medium further diminished the portal responses to endothelin-1, although this reduction in portal response was not significantly different from the responses obtained during FR 139317 infusion alone (Fig. 4a). Administration of BQ-788 prior to FR 139317 slightly reduced the responses to endothelin-1 (Fig. 4b). However, subsequent addition of FR 139317 resulted in significant reduction in portal inflow resistance changes following injection of endothelin-1 (Fig. 4b). These observations indicate that endothelin ET_A receptors predominantly mediate the portal vascular responses to endothelin-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, Fig. 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 ($P < 0.05$, Fig. 5a). Treatment with FR 139317 alone did not significantly affect the vascular responses to IRL 1620 (Fig. 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 endothelin ET_B receptor agonist (Fig. 5b).

Perfusion of the preparation with FR 139317, BQ-788 or combination of both did not modify the portal vascular responses to noradrenaline (50 nmol); data not shown. Noradrenaline-, ET-1- and IRL 1620-induced increase in portal inflow resistance at the end of the experiments was maintained (data not shown).

3.3 Effects of cyclooxygenase and NO synthase inhibition. Continuous intraportal and intra-arterial perfusion with L-NAME did not significantly affect basal portal inflow resistance (0.15 ± 0.02 mmHg.ml⁻¹.min). Although the perfusion of both hepatic inflow circuits with indomethacin increased basal portal inflow resistance (0.5 ± 0.3 mmHg.ml⁻¹.min), it did not reach statistical significance.

Under control conditions, intraportal administration of endothelin-1, IRL 1620 and noradrenaline resulted in dose-dependent increases in portal inflow resistance (Fig. 6a, b and c).

3.3.1 Indomethacin. Indomethacin treatment ($5.6 \mu\text{M}$) alone significantly ($P < 0.05$) augmented portal inflow resistance changes in response to the higher doses of intraportal endothelin-1 and noradrenaline (Fig. 6a and 6c). In contrast, the portal vascular response to any dose of IRL 1620 was not affected significantly by indomethacin treatment (Figure 6b).

3.3.2 L-NAME. Intraportal and intra-arterial perfusion with the NO synthase inhibitor L-NAME alone significantly ($P < 0.05$) potentiated the increase in hepatic portal vascular resistance due to both intraportal endothelin-1 and noradrenaline injection (Fig. 6a and 6c), but not the response following the administration of IRL 1620 (Fig. 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 endothelin-1 (Fig. 6a) and noradrenaline (Fig. 6c). The addition of indomethacin to L-NAME significantly increased the portal response to endothelin-1 above that response obtained to L-NAME alone (Fig.

6a). In contrast, the portal response to IRL 1620 was not significantly changed by infusion of neither indomethacin or L-NAME alone nor the combination of both L-NAME and indomethacin (Fig. 6b).

4. Discussion

The response of any vascular bed to endothelin agonists depends upon the distribution of endothelin ET_A and ET_B receptors and the intrinsic efficacy of the agonists. In the present experiments in the isolated perfused canine liver, the use of selective, and mixed, endothelin agonists has revealed the presence of both endothelin 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 endothelin 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, endothelin ET_A receptor antagonism exerted no significant effects on whole organ haemodynamic changes to endothelin-1 and, furthermore, endothelin ET_B receptor antagonism significantly inhibited the increase in portal pressure accompanying endothelin-1 infusion. In contrast, Zhang et al. (1997) and Wang et al. (1997), using a rat and rabbit liver model, respectively, found that neither endothelin ET_A nor ET_B receptor antagonism completely inhibited the portal response of endothelin-1; however the two antagonists together did. The discrepancy between these 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., 1995) in the canine arterial system where a distribution of endothelin ET_A receptors only could be demonstrated, since the

selective endothelin ET_B receptor agonist, IRL 1620, "failed to affect the hepatic arterial vascular resistance even at the highest dose used (1.2 nmol)", indicating a total absence of endothelin ET_B receptors. In addition we have demonstrated that the endothelin ET_A and ET_B receptors situated within the portal inflow circuit, and potentially able to alter portal inflow haemodynamics, can be activated by agonists not only in the portal inflow but also by access from the arterial inflow. Wang et al. (1997) suggested that endothelin-1-induced increase in portal vascular resistance is dependent upon contraction of the portal vein directly, without major effects on intrahepatic regulation of portal flow. In the present experiments, a selective endothelin ET_B agonist (IRL 1620; Takai et al., 1992) and endothelin-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 and 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 endothelin ET_A and ET_B receptors as the results of local and systemic release of the appropriate endothelin agonists.

The functional implications of these arterial-portal interactions is substantial since it proposes that elevated systemic arterial levels of endothelin ET_B receptor agonists such as endothelin-1 and endothelin-3 may increase hepatic portal vascular resistance without necessarily entering the liver in the portal inflow. Elevated systemic levels of partial endothelin ET_B receptor agonists (endothelin-1/endothelin-3) have been reported in various diseases states associated with liver

disfunction and/or portal hypertension. Moller et al. (1995) described that hepatic venous and femoral arterial levels of endothelin-1 and endothelin-3 were significantly higher in cirrhosis and that compared with normal there was elevated hepato-splanchnic release of endothelin-1 and endothelin-3. Clearly, some components of the disordered hepatic haemodynamics seen in clinical situations could rise from elevated systemic levels of endothelin ET_B receptor agonists provoking reduced hepatic portal perfusion.

In the present study the portal vasoconstrictor responses to endothelin ET_A receptor 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 endothelin-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 endothelin ET_B receptor activation by the agonist IRL-1620. This may reflect the spatial location of the endothelin ET_B receptor sites within the liver and their vicinity to endothelial sources of NO and prostacyclin. Recent studies have examined the distribution of endothelin ET_A and ET_B receptors among the cell population of the liver (Housset *et al.*, 1993) and revealed that the greatest density of endothelin 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 and Weisiger, 1996) contract in response to addition of endothelin-1 and the selective endothelin ET_B receptor agonist, sarafotoxin 6c. These cells may therefore potentially influence portal haemodynamics by mechanical restriction, consequently increasing the resistance of the low pressure system of portal inflow channels.

In conclusion, our studies using the canine liver perfusion indicate that endothelin ET_A receptors modulate the hepatic arterial resistance whilst both endothelin ET_A and ET_B receptors can influence portal inflow resistance.

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.

5. References

- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., Makanishi, S., 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, 730-732.
- Battista, S., Bar, F., Mengozzi, G., Zanon, E., Cirosso, M., Molino, G., 1997. Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. *J. Hepatol.* 26, 75-80.
- Clozel, M., Gray, G. A., Breu, W., Loffler, B-M., Oster-Walder, R., 1992. The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 867-873.
- Faro, R., Grassi-Kassisse, D.M., Donato, J. L., Boin, I., Opgenorth, T. J., Withrington, P. G., Zatz, R., Antunes, E., De Nucci, G., 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-S208.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kassuya, Y., Miyachi, T., Goto, K., Masaki, T., 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2863-2867.
- Moller, S., Gulberg, V., Henriksen, J. H., Gerbes, A. L., 1995. Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *J. Hepatol.* 23, 135-144.

- De Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T., Vane, J. R., 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, 9797-9800.
- 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., Sato, N., 1994. Vasoactive effect of endothelin-1 on rat liver in vivo. *Hepatology* 19, 155-161.
- Opgenorth, T. J., 1995. Endothelin receptor antagonism. *Adv. Pharmacol.* 33, 1-65.
- Richardson, P. D. I., Withrington, P. G., 1978. Pressure-flow relationships and effects of noradrenaline and isoprenaline on hepatic arterial and portal venous vascular beds of dog. *J. Physiol.* 282, 451-470.
- Rockey, D. C., 1995. Characterization of endothelin receptors mediating rat stellate cell contraction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 207, 725-731.
- Rockey, D., Weisiger, R. A., 1996. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 24, 233-240.
- Sumner, M. J., Cannon, T. R., Mundin, J. W., White, D. G., Watts, I. S., 1992. Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.* 107, 858-860.

- Takai, M., Umemura, I., Yamasaki, K., Watakabe, T., Fujitani, Y., Oda, K., Urade, Y., Inui, T., Yamamura, T., Okada, T., 1992. A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 953-959.
- Wang, H-G., Shibamoto, T., Miyahara T, 1997. Endothelin-1 selectively contracts portal vein through both ET_A and ET_B receptors in isolated rabbit liver. *Am. J. Physiology* 273, G1036-G1043.
- Warner, T. D., Allcock, G. H., Corder, R., Vane, J.R., 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, 777-782.
- Withrington, P. G., De Nucci, G., Vane, J. R., 1989. Endothelin-1 causes vasoconstriction and vasodilation in the blood perfused liver of the dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13, S209-S210.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 323, 411-415.
- Zhang, B., Calmus, Y., Wen, L., Sogni, P., Lotersztajn, S., Houssin, D., Weill, B., 1997. Endothelin-1 induces liver vasoconstriction through both ET_A and ET_B receptors. *J. Hepatol.* 26, 1104-1110.

Zhang, J. X., Bauer, M., Clemens, M. G., 1995. Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. *Am. J. Physiol.* 269, G269-G277.

6. Table

Table 1: Changes in portal inflow resistance (mean $\pm$ s.e.m., results expressed as mmHg.ml⁻¹.min) following repeated administration of endothelin receptor agonists. Each set consists of complete dose-response curves to both endothelin-1 and IRL 1620, constructed consecutively.

Agonist (pmol)	Set 1	Set 2	Set 3
<i>Intraportal ET-1</i>			
40	0.014 $\pm$ 0.009	0.006 $\pm$ 0.002	0.016 $\pm$ 0.009
100	0.022 $\pm$ 0.007	0.016 $\pm$ 0.004	0.012 $\pm$ 0.004
400	0.040 $\pm$ 0.013	0.038 $\pm$ 0.011	0.036 $\pm$ 0.011
<i>Intra-arterial IRL 1620</i>			
100	0.006 $\pm$ 0.006	0.010 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.008
400	0.030 $\pm$ 0.015	0.036 $\pm$ 0.012	0.035 $\pm$ 0.019
1000	0.066 $\pm$ 0.031	0.056 $\pm$ 0.022	0.054 $\pm$ 0.032
<i>Intraportal IRL 1620</i>			
100	0.016 $\pm$ 0.006	0.012 $\pm$ 0.002	0.017 $\pm$ 0.012
400	0.034 $\pm$ 0.011	0.038 $\pm$ 0.008	0.040 $\pm$ 0.019
1000	0.060 $\pm$ 0.013	0.063 $\pm$ 0.013	0.040 $\pm$ 0.016

7. Figure Legends

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).

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

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

Figure 4: (a) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal endothelin-1 (ET-1) before (open circles), during endothelin ET_A receptor antagonism alone (open squares, FR 139317) and both endothelin ET_A and ET_B receptor antagonism (solid squares, FR 139317 plus BQ-788). (b) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal endothelin-1 before (open circles), during endothelin ET_B receptor antagonism alone (open squares, BQ-788) and both endothelin ET_B and ET_A receptor antagonism (solid squares, BQ-788 plus FR 139317). Asterisks denote significant difference from control (* $P<0.05$).

Figure 5: (a) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal IRL 1620 before (open circles), during endothelin ET_B receptor antagonism alone (open squares, BQ-788) and both endothelin ET_B and ET_A receptor antagonism (solid squares, BQ-788 plus FR 139317). (b) Increase in hepatic inflow resistance to intraportal IRL 1620 before (open circles), during endothelin ET_A receptor antagonism alone (open squares, FR 139317) and both endothelin ET_A and ET_B receptor antagonism (solid squares, FR 139317 plus BQ-788). Asterisks denote significant difference from control (*P<0.05).

Figure 6: Increases in hepatic portal vascular resistance in response to intraportal injection of (a) endothelin-1, (b) IRL 1620, and (c) noradrenaline under control conditions (open circles), during infusion of indomethacin (solid circles), 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/or prostaglandin synthesis by continuous perfusion with indomethacin (5.6µM), L-NAME (10µM), or both L-NAME plus indomethacin significantly (P<0.05) augmented the endothelin-1- and noradrenaline-induced increase in portal inflow resistance, while not affecting IRL 1620-induced responses.

