

# Modulação dos Efeitos Miocárdicos da Estimulação Selectiva dos Receptores ET<sub>B</sub> e suas Implicações na Insuficiência Cardíaca [80]

CARMEN BRÁS-SILVA, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

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

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

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

### Modulation of the Myocardial Effects of Selective ET<sub>B</sub> Receptor Stimulation and its Implications for Heart Failure

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

*Methods:* The study was performed on right papillary muscles from New Zealand white rabbits (n = 39; Krebs-Ringer; 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>; 35 °C). The effects of sarafotoxin S6c (SRTXc, ET<sub>B</sub> agonist; 0.2µ M) were evaluated in muscles with: (i) intact endocardial endothelium (EE) (n = 6); (ii) damaged EE (Triton X100; 0.5 %; n = 6); (iii) intact EE, in the presence of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, nitric oxide synthase inhibitor; n = 6); (iv) intact EE, in the presence of indomethacin (INDO, cyclooxygenase inhibitor; n = 6); (v) intact EE, in the presence of BQ-123 (ET<sub>A</sub> antagonist; n = 7); and (vi) damaged EE, in the presence of BQ-123 (n = 8). Only significant results (mean ± SEM, p < 0.05) are given, expressed as % change from baseline.

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

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

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

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

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

#### Palavras-Chave

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

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

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

#### Key words

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

## INTRODUÇÃO

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

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

## INTRODUCTION

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

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

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

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

Descrevemos, recentemente, os efeitos miocárdicos resultantes da estimulação selectiva dos receptores ET<sub>B</sub><sup>(6,7)</sup>. No presente estudo, investigámos os mecanismos subcelulares que lhes estão subjacentes, bem como a sua modulação pelo endotélio endocárdico e pela estimulação dos receptores ET<sub>A</sub>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação experimental

O estudo foi realizado em músculos papilares isolados do ventrículo direito de coelhos brancos neo-zelandeses (*Oryctolagus cuniculus*; n = 39). Os animais foram anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg, *iv*), o coração rapidamente excisado e os músculos papilares dissecados e imediatamente colocados numa solução de Krebs-Ringer (composição em mM: NaCl 98; KCl 4,7; MgSO<sub>4</sub> 2,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; glicose 4,5; CaCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 20; C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> 15; atenolol 0,02) a 35 °C com a substância cardioplégica BDM (C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>) a 3 %. Os músculos papilares foram montados verticalmente em banho próprio e conectados a um transdutor isotónico/isométrico (University of Antwerp, Belgium). Após 10 minutos iniciou-se a estimulação eléctrica com uma frequência de 0,6 Hz durante mais 10 minutos, ao fim dos quais se procedeu à substituição da solução com BDM por outra de composição semelhante, mas sem BDM. Os múscu-

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

In recent studies, we described the myocardial effects of selective ET<sub>B</sub> receptor stimulation<sup>(6,7)</sup>. The aim of the present study was to investigate the subcellular mechanisms underlying these effects, as well as their modulation by endocardial endothelium and by ET<sub>A</sub> receptor stimulation.

## METHODS

### Experimental preparation

The study was performed on right ventricular papillary muscles from New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*; n = 39). The animals were anesthetized with pentobarbital (25 mg/kg, *iv*), the heart was rapidly excised, and the papillary muscles dissected and immediately placed in Krebs-Ringer solution (composition in mM: NaCl 98; KCl 4.7; MgSO<sub>4</sub> 2.4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; glucose 4.5; CaCl<sub>2</sub> 1.8; NaHCO<sub>3</sub> 20; C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> 15; atenolol 0.02) at 35 °C, together with the cardioplegic agent BDM (C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>) at 3 %. The papillary muscles were mounted vertically in a special vessel and connected to an isotonic/isometric transducer (University of Antwerp, Belgium) for 10 minutes. Electrical stimulation was then begun, at a frequency of 0.6 Hz, for a further 10 minutes, after which the solution was replaced with one of a similar composition but without BDM. The muscles then began to contract with a preload estimated according to their size, and an afterload of around 10 % of preload. After stabilization (2 hours), L<sub>max</sub>, which is the muscle length at rest that determines maximum active tension, was determined.

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

### Protocolo experimental

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

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

### Análise dos dados

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

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

### Experimental protocol

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

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

### Data analysis

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

### Statistical analysis

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

### Análise estatística

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

### RESULTADOS

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

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

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

### RESULTS

Mean values of contractile parameters in papillary muscle with intact EE ( $n=25$ ) were similar in all the experimental protocols under baseline conditions: AT  $25.8 \pm 2.5$  mN/mm<sup>2</sup>; dT/dt<sub>max</sub>  $169.0 \pm 18$  mN/mm<sup>2</sup>.s; dT/dt<sub>min</sub>  $-124.4 \pm 10.7$  mN/mm<sup>2</sup>.s; PS  $14.6 \pm 0.02$  % of L<sub>max</sub>; dL/dt<sub>max</sub>  $0.85 \pm 0.06$  L<sub>max</sub>.s<sup>-1</sup>; dL/dt<sub>min</sub>  $-3.4 \pm 0.26$  L<sub>max</sub>.s<sup>-1</sup>; tHR  $413.1 \pm 11.9$  ms. Removal of EE resulted in decreased inotropy and lusitropy. Mean values of contractile parameters in papillary muscles with damaged EE ( $n=14$ ) were: AT  $18.0 \pm 2.3$  mN/mm<sup>2</sup>; dT/dt<sub>max</sub>  $109.7 \pm 11.6$  mN/mm<sup>2</sup>.s; dT/dt<sub>min</sub>  $-85.7 \pm 9.8$  mN/mm<sup>2</sup>.s; PS  $10.1 \pm 0.1$  % of L<sub>max</sub>; dL/dt<sub>max</sub>  $0.65 \pm 0.07$  L<sub>max</sub>.s<sup>-1</sup>; dL/dt<sub>min</sub>  $-2.26 \pm 0.255$  L<sub>max</sub>.s<sup>-1</sup>; tHR  $433.2 \pm 14.1$  ms.

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

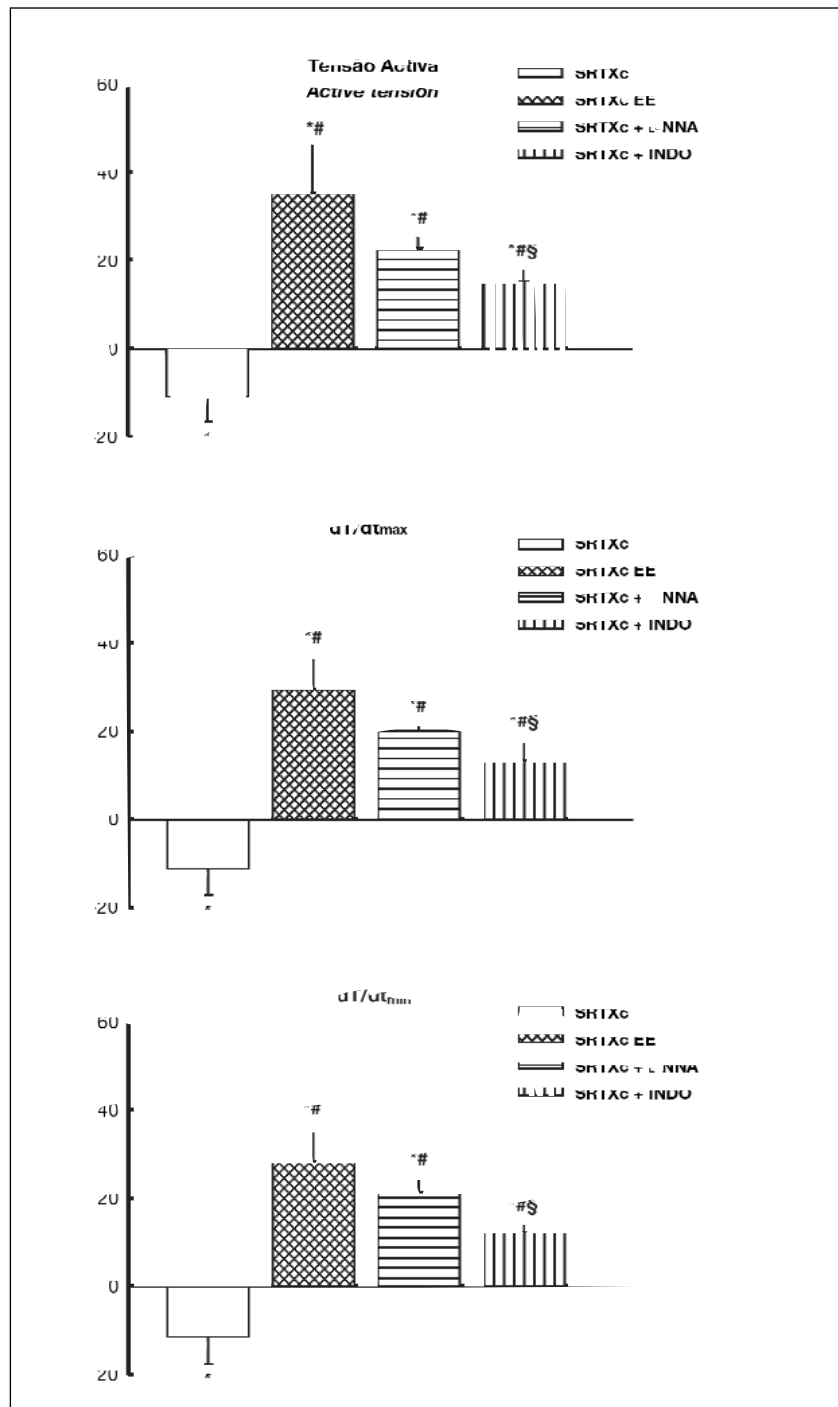
The addition of SRTXc ( $0.2$  M) induced a negative inotropic effect in the muscles with intact EE, reducing AT by  $11.0 \pm 5.6$  %, dT/dt<sub>max</sub> by  $11.2 \pm 5.9$  %, and dT/dt<sub>min</sub> by  $11.5 \pm 6.2$  %. By contrast, in muscles with damaged EE or in the presence of L-NNA or INDO,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

### DISCUSSION

This study investigated the mechanisms underlying the effects of selective ET<sub>B</sub> receptor stimulation. We have previously demonstrated that receptor stimulation induces a negative inotropic effect<sup>(6,7)</sup>. The present study confirmed

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

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



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

## DISCUSSÃO

Este estudo permitiu investigar os mecanismos moduladores dos efeitos da estimulação seletiva dos receptores tipo B da  $ET-1$ . Demonstramos anteriormente que, a ativação dos

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

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

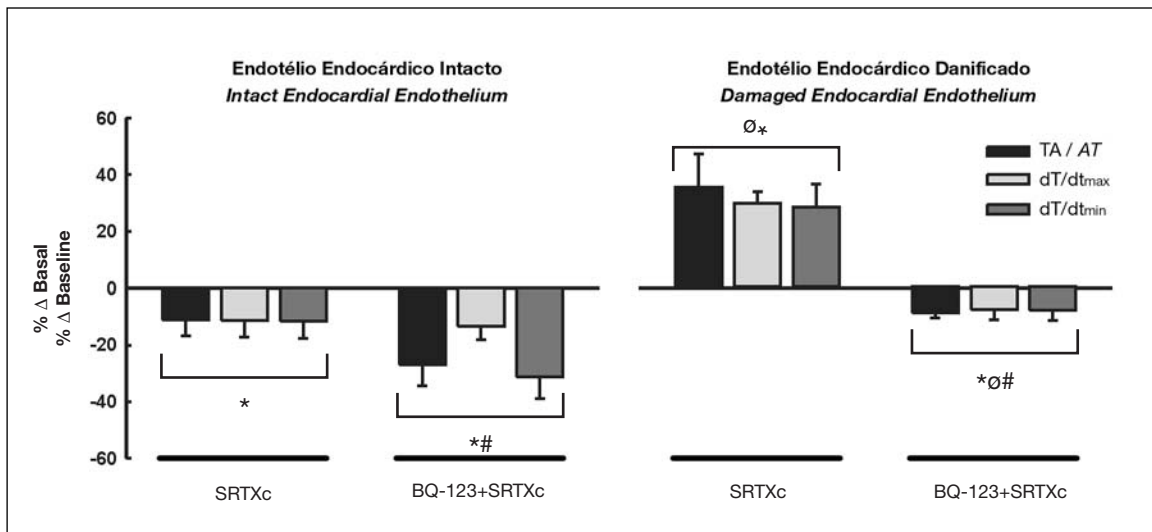


Fig. 2 Efeitos da estimulação selectiva dos receptores  $ET_B$  ( $0,2\mu M$ ) pela Sarafotoxina S6c (SRTXc), na ausência e na presença de BQ-123 em músculos papilares com endotélio endocárdico intacto e danificado. \* $p < 0,05$  vs. Basal;  $^{\circ}p < 0,05$  vs. EE Intacto; #  $p < 0,05$  vs. SRTXc.

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

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

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

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

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

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

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

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

## CONCLUSÕES

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

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

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

## CONCLUSIONS

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



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

### AGRADECIMENTOS

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

### ACKNOWLEDGEMENTS

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

Pedidos de separatas para:  
Address for reprints:

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

### BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

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