

## ARTIGOS ORIGINAIS CONCISOS

# A Grelina Reverte as Alterações Moleculares, Estruturais e Hemodinâmicas Ventriculares Direitas Presentes na Hipertensão Pulmonar [5]

TIAGO HENRIQUES-COELHO, ROBERTO RONCON-ALBUQUERQUE JR., ANDRÉ P. LOURENÇO,  
MARIA J. BAPTISTA, SÍLVIA M. OLIVEIRA, ANA BRANDÃO-NOGUEIRA,  
JORGE CORREIA-PINTO, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal  
Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde, Escola Ciências da Saúde, Universidade do Minho, Braga, Portugal

Rev Port Cardiol 2006; 25 (1): 55-63

## RESUMO

A grelina é um peptídeo endógeno que exerce os seus efeitos através da estimulação de receptores específicos e da secreção de hormona de crescimento. Vários estudos têm demonstrado que a grelina é um potente vasodilatador. Recentemente, demonstrámos que a administração exógena de grelina modula os seus níveis endógenos e atenua as principais alterações induzidas pela monocrotalina (MCT). No presente estudo avaliámos os efeitos da administração crónica de grelina sobre os parâmetros hemodinâmicos e morfométricos ventriculares direitos e sobre os níveis miocárdicos de SERCA2a e endotelina-1.

Ratos adultos Wistar foram injectados com MCT (60 mg/kg; sc) ou apenas com o veículo (n=7; Grupo Ctrl). Após uma semana, os ratos injectados com MCT foram tratados com grelina (100 µg/kg; sc; bid; n=9; Grupo MCT-Gr) ou apenas com solução salina (n=9; ip; bid; Grupo MCT) durante duas semanas.

Entre os dias 22 e 25, foram avaliadas as pressões ventriculares direitas (VD); o coração e os pulmões foram excisados e foram colhidas amostras para a análise histológica e molecular. O tratamento com grelina atenuou a maior parte das alterações induzidas pela MCT: área de secção transversa dos miócitos, espessura da parede das artérias pulmonares periféricas (expressa em percentagem do diâmetro externo), pressão máxima VD, pressão telediastólica VD, constante de tempo  $\tau$  do VD, e níveis

## ABSTRACT

## Ghrelin Reverses Molecular, Structural and Hemodynamic Alterations of the Right Ventricle in Pulmonary Hypertension

Ghrelin is an endogenous peptide that has a dual effect by activating specific receptors and by stimulating release of growth hormone. There is increasing evidence that ghrelin has a potent vasodilator effect. Recently, we demonstrated that exogenous administration of ghrelin modulates its endogenous levels and attenuates the majority of alterations induced by monocrotaline (MCT). In the present study, we evaluate the effects of chronic administration of ghrelin on hemodynamic and morphometric parameters of the right ventricle, as well as on myocardial levels of SERCA2a and endothelin-1.

Adult Wistar rats were injected with MCT (60 mg/kg, sc) or just the vehicle (day 0). One week later, the animals treated with MCT were randomly divided into two groups and treated with ghrelin (100 µg/kg, bid, sc) or with a similar volume of vehicle. Between days 21-25 the animals were instrumented to record right ventricular (RV) pressures and samples were collected for morphological and molecular analysis. Ghrelin treatment attenuated the effects of MCT, namely: RV myocyte fiber diameter, pulmonary vascular remodeling (evaluated by % medial wall thickness of peripheral arteries), RV peak systolic pressure, RV end-diastolic pressure,

miocárdicos de ARNm de SERCA2a e endotelina-1.

A administração de grelina atenuou as alterações estruturais e hemodinâmicas induzidas pela MCT, melhorou os níveis miocárdicos de SERCA2a e reverteu a elevação da expressão de ET-1 no ventrículo direito. Deste modo, a grelina poderá desempenhar um papel importante na fisiopatologia da hipertensão pulmonar.

#### Palavras-Chave

Função ventricular direita; Remodelagem vascular; Neuro-humoral

time constant  $\tau$ , and SERCA2a and endothelin-1 mRNA levels.

Chronic ghrelin administration attenuates MCT-induced pulmonary hypertension, vascular remodeling and RV hypertrophy. These results suggest a potential therapeutic role for the ghrelin-growth hormone axis in pulmonary hypertension.

#### Key words

Right ventricular function; Vascular remodeling; Neurohumoral

## INTRODUÇÃO

A grelina é o ligando endógeno do receptor dos secretagogos da hormona de crescimento (GHSR) e um potente indutor da secreção da hormona de crescimento (HC). Vários estudos demonstraram que o eixo HC/IGF-1 melhora a função miocárdica em condições normais e de falência. Deste modo, a grelina poderá ter efeitos benéficos na insuficiência cardíaca por estimulação deste eixo, o qual está associado a melhoria da função sistólica VE e se relaciona, pelo menos em parte, com o aumento da expressão da SERCA2a<sup>(1)</sup>. De facto, a administração de grelina aumenta o débito cardíaco e reduz a pós-carga em corações normais e insuficientes<sup>(2,3)</sup>. Por outro lado, a grelina é um vasodilatador muito potente cuja acção parece ser independente do endotélio e da HC<sup>(4)</sup> tendo o nosso grupo demonstrado recentemente que a sua administração crónica melhora as principais alterações da hipertensão pulmonar (HTP) induzidas pela monocrotalina (MCT)<sup>(5)</sup>.

A HTP é uma doença progressiva que frequentemente progride para insuficiência cardíaca e que se acompanha de alterações neuro-humorais, nomeadamente da activação do eixo da endotelina-1 (ET-1). O bloqueio da via da ET-1 parece ter resultados benéficos no tratamento da HTP<sup>(6)</sup> e foi sugerido que a grelina pode exercer um antagonismo fisiológico aos efeitos vasoconstritores da ET-1<sup>(4)</sup>. Desconhece-se, no entanto, qual o efeito da grelina sobre os níveis de ET-1.

Neste estudo propusemo-nos investigar os efeitos hemodinâmicos, estruturais e

## INTRODUCTION

Ghrelin is the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and a potent inducer of growth hormone (GH) release. Various studies have demonstrated that the GH/IGF-1 axis improves myocardial function in normal and failing hearts. Thus, ghrelin may have beneficial effects in heart failure through stimulation of this axis, which has been linked to improvement in left ventricular (LV) systolic function and is related at least partly to increased expression of SERCA2a<sup>(1)</sup>. Administration of ghrelin increases cardiac output and reduces afterload in normal and failing hearts<sup>(2,3)</sup>. In addition, ghrelin is a potent vasodilator, whose action appears to be endothelium- and GH-independent<sup>(4)</sup>; our group has recently demonstrated that chronic administration of ghrelin improves the majority of alterations in pulmonary hypertension (PHT) induced by monocrotaline (MCT)<sup>(5)</sup>.

PHT is a progressive disease that frequently leads to heart failure and is accompanied by neurohumoral changes, particularly activation of the endothelin-1 (ET-1) axis. Blocking the ET-1 pathway seems to have beneficial effects in the treatment of PHT<sup>(6)</sup>, and it has been suggested that ghrelin may act as a physiological antagonist of the vasoconstrictor effects of ET-1<sup>(4)</sup>. The effect of ghrelin on ET-1 levels is, however, unknown.

In the present study, we set out to evaluate the hemodynamic, structural and molecular effects of ghrelin administration in an

moleculares da administração de grelina no modelo experimental de HTP induzido pela MCT. A nossa hipótese é a de que a grelina possa modular os níveis miocárdicos de SERCA2a e de ET-1.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desenho do estudo

O protocolo experimental foi levado a cabo segundo a lei Portuguesa de experimentação animal respeitando as normas do Guia de cuidados e utilização de animais de laboratório publicado pelo *US National Institutes of Health* (Publicação da NIH N.º 85-23, revisão de 1996). Ratos Wistar, machos adultos (Charles-River, Barcelona, Espanha) com pesos compreendidos entre 180 e 200 g foram separados em grupos de cinco animais por caixa e acomodados em ambiente controlado sob ciclos de 12 horas de luz/escuridão, com temperatura ambiente de 22 °C, sem restrições de água ou alimento. Os animais foram divididos aleatoriamente: um grupo recebeu uma injeção subcutânea (sc) de MCT (60 mg/kg; Sigma), enquanto o outro recebeu um volume igual apenas com o veículo (1 mL/kg). Após uma semana, os animais tratados com MCT foram subdivididos em dois grupos aos quais foi administrada grelina (100 µg/kg) ou apenas solução salina por injeção subcutânea duas vezes por dia, durante duas semanas. Como apenas os primeiros cinco aminoácidos contendo o ácido octanoico na Ser<sup>3</sup> são suficientes para as acções da grelina, foi utilizado um fragmento activo da grelina (Peptides International, PGH-3628-PI, Human, Rat, 1-5).

O desenho do estudo resultou em três grupos: *i*) ratos injectados com MCT e tratados com grelina (MCT-Gr, n=9), *ii*) ratos injectados com MCT e tratados com solução salina (MCT, n=9), e *iii*) ratos normais injectados com uma única injeção de solução salina (Ctrl, n=7).

### Estudos Hemodinâmicos

A preparação experimental foi semelhante à descrita anteriormente em detalhe<sup>(7)</sup>. Em resumo, os animais foram anestesiados com pentobarbital (6 mg/100 g, ip), colocados sobre uma placa de aquecimento e traqueostomizados para ventilação mecânica com oxigénio medicinal (Harvard Small Animal Ventilator,

experimental model of MCT-induced PHT. Our hypothesis was that ghrelin can modulate myocardial levels of SERCA2a and ET-1.

## METHODS

### Study design

The experimental protocol was conducted in accordance with Portuguese law governing animal experimentation and with the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, 1996 revision). Adult male Wistar rats (Charles River, Barcelona, Spain), weighing between 180 and 200g, were divided into groups of 5 animals per cage and kept in a controlled environment with 12-hour cycles of light and darkness, at an ambient temperature of 22 °C, with unrestricted access to water and food. The animals were randomly divided into two groups, with one group receiving a subcutaneous injection of MCT (60 mg/kg; Sigma) and the other a similar volume of vehicle only (1 mL/kg). One week later, the animals treated with MCT were subdivided into two groups and treated with ghrelin (100 µg/kg) or saline solution only, by subcutaneous injection twice a day, for two weeks. As only the first five amino acids at Ser<sup>3</sup> containing octanoic acid are necessary for the activity of ghrelin, an active fragment of ghrelin was used (Peptides International, PGH-3628-PI, Human, Rat, 1-5).

The study design resulted in three groups: *i*) rats injected with MCT and treated with ghrelin (MCT-Ghr, n=9); *ii*) rats injected with MCT and treated with saline solution (MCT, n=9); and *iii*) control rats that received a single injection of saline solution (Ctrl, n=7).

### Hemodynamic studies

The experimental preparation was similar to that previously described in detail<sup>(7)</sup>. Briefly, the animals were anesthetized with pentobarbital (6 mg/100 g, ip), placed on a warmed plate, and tracheotomized for mechanical ventilation with medicinal oxygen (Harvard Small Animal Ventilator, model 683). Anesthesia was maintained with a bolus of pentobarbital (2 mg/100 g, ip). The right jugular vein was catheterized under microscopic control (Leica, Wild M651.MS-D) in order to administer fluids (0.9% NaCl solution)

Model 683). A anestesia foi mantida por bólus de pentobarbital (2 mg/100 g, ip). A veia jugular direita foi cateterizada sob controlo microscópico (Leica, Wild M651.MS-D), para administração de fluídos (solução de 0,9 % NaCl) de forma a compensar perdas perioperatórias. O coração foi exposto por esternotomia mediana e o pericárdio rebatido. Foi introduzido um catéter de pressão de alta fidelidade (SPR-324, Millar Instruments) no ventrículo direito para medição das pressões VD. Os registos hemodinâmicos foram realizados com a ventilação suspensa no final da expiração. As pressões VD foram medidas na telediástole e no pico sistólico. Foram também medidas a velocidade máxima de elevação da pressão ( $dP/dt_{\max}$ ) e a velocidade de relaxamento, estimada através da constante de tempo  $\tau$  <sup>(8)</sup>.

Após a aquisição dos dados hemodinâmicos, foi induzida paragem cardíaca por injeção de KCl 7,5 % através do catéter venoso central. Foram colhidas amostras de pulmão e do VD para análise morfométrica e molecular.

### Análise Morfométrica

As amostras provenientes do VD e do pulmão direito foram fixadas em formol a 10 % e incluídas em parafina. De seguida, foram cortadas em fragmentos com 7 mm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

As amostras da parede livre do VD foram colhidas a meia distância entre o ápex e a base do ventrículo. As amostras analisadas foram fotografadas com câmara digital e a área das fibras musculares medida (Olympus DP Sof. Version 3.0). As medições foram realizadas directamente com uma ampliação de 400 x e apenas as fibras musculares cujo corte transversal incluía um núcleo foram analisadas. Fotografaram-se cinco secções por amostra e procedeu-se à medição de dez fibras musculares por secção, o que perfaz um total de 50 fibras analisadas por amostra, cuja média foi posteriormente calculada.

As amostras de pulmão provenientes de cada animal foram colhidas da região média do lobo superior direito. O diâmetro externo e a espessura da parede das artérias musculares foram analisados em cada secção de pulmão com uma ampliação de 400 x. Utilizaram-se intercepções ortogonais de forma a calcular o diâmetro externo das artérias (distância entre as lâminas externas) em oito localizações e a

to compensate for perioperative losses. The heart was exposed by median sternotomy and the pericardium pulled back. A high-fidelity micromanometer (SPR-324, Millar Instruments) was inserted in the right ventricle (RV) to measure RV pressures. Hemodynamic measurements were taken with ventilation suspended at end-expiration. RV pressures were assessed at end-diastole and peak systole. The maximum velocity of the pressure rise ( $dP/dt_{\max}$ ) and relaxation rate determined by the time constant were also measured <sup>(8)</sup>.

Following acquisition of the hemodynamic data, cardiac arrest was induced by injection of 7.5 % KCl via the central venous catheter. Lung and RV samples were collected for morphometric and molecular analysis.

### Morphometric analysis

The samples from the right ventricle and right lung were fixed in 10 % formalin and embedded in paraffin. They were then sliced into sections 7 mm thick and stained with hematoxylin and eosin.

RV free wall samples were collected from midway between the apex and the base of the ventricle. The samples to be analyzed were photographed with a digital camera (Olympus DP-Soft version 3.0) and the area of muscle fibers measured. The measurements were taken directly at x 400 magnification and only transverse sections of muscle fiber containing a nucleus were analyzed. Five sections per sample were photographed and ten muscle fibers per section measured, making a total of 50 fibers analyzed per sample, for which the mean was subsequently calculated.

The lung samples were collected from the medial section of the right upper lobe. The external diameter and wall thickness of the muscle arteries were analyzed in each section of lung at x 400 magnification. Orthogonal intercepts were used to calculate the external diameter of the arteries (distance between the outer layers) at 8 sites and arterial wall thickness (distance between the outer and inner layers) at 16 sites. Medial hypertrophy was estimated using the following formula:

$$\text{Wall thickness (\%)} = [( \text{wall thickness} \times 2 ) / (\text{external diameter})] \times 100.$$

espessura da parede das artérias (distância entre as lâminas externa e interna) em 16. A hipertrofia da média foi estimada a partir da fórmula:

$$\text{Espessura Parede (\%)} = [(\text{espessura da parede} \times 2) / (\text{diâmetro externo})] \times 100.$$

### Estudos Moleculares

As amostras da parede livre do VD foram processadas e a extracção do ARNm total foi realizada pelo método de guanídeo-tiocianato e ligação a membrana de sílica-gel, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen 74124). Para cada amostra, a síntese do ADNc total foi feita por transcrição reversa (RT) a partir de 50 ng de ARNm total da amostra: 40 U transcriptase reversa (Invitrogen 18064-014); 20 U inibidor de RNAses (Promega N2515); 0,6 mg *random primers* (Invitrogen 48190-011); 0,5 mM nucleótidos; 1,9 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT. Dez por cento do produto da RT foi usado para amplificar os genes de interesse por *real-time PCR* (Corbett-Research Rotor-Gene 2000; 20 µl por tubo), utilizando SYBR Green (Qiagen 204143). Os *primers* foram: **SERCA2a** fw 5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' e rev 5'-GGA GGA GAT GAG GTA GCG GAT GGA-3'; **Endotelina-1 (ET-1)** fw: 5'-CCA TGC AGA AAG GCG TAA AAG-3' e rev: 5'-CGG GGC TCT GTA GTC AAT GTG-3'; **GAPDH** fw 5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3' e rev 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTAS CCC-3'. Foram construídas curvas-padrão para cada gene durante o *real-time RT-PCR* para uma série de diluições do ARNm total isolado. O GAPDH foi usado como gene normalizador. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (AU) usando o grupo controlo como referência.

### Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± EPM e foram analisados utilizando o teste *One-Way ANOVA*. Quando os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de *Student-Newman-Keuls* para as comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Hemodinâmica

Os dados hemodinâmicos encontram-se sumariados na *Fig. 1*. A PVD sistólica máxima

### Molecular study

RV free wall samples were processed and total mRNA was extracted through the guanidinium-thiocyanate silica-gel membrane-binding method, in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen 74124). For each sample, total cDNA was synthesized using reverse transcription (RT) of 50 ng of the sample's total mRNA: 40 U reverse transcriptase (Invitrogen 18064-014); 20 U RNAase inhibitor (Promega N2515); 0.6 mg random primers (Invitrogen 48190-011); 0.5 mM nucleotides; 1.9 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT. Ten percent of the RT product was used to amplify the genes under study by real-time PCR (Corbett-Research Rotor-Gene 2000; 20 µl per tube), using SYBR Green (Qiagen 204143). The primers were: SERCA2a fw 5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' and rev 5'-GGA GGA GAT GAG GTA GCG GAT GGA-3'; endothelin-1 (ET-1) fw: 5'-CCA TGC AGA AAG GCG TAA AAG-3' and rev: 5'-CGG GGC TCT GTA GTC AAT GTG-3'; GAPDH fw 5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3' and rev 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTAS CCC-3'. Standard curves were constructed for each gene during real-time RT-PCR for a series of dilutions of isolated total mRNA. GAPDH was used as the housekeeping gene. The results were expressed in arbitrary units (AU), using the control group as reference.

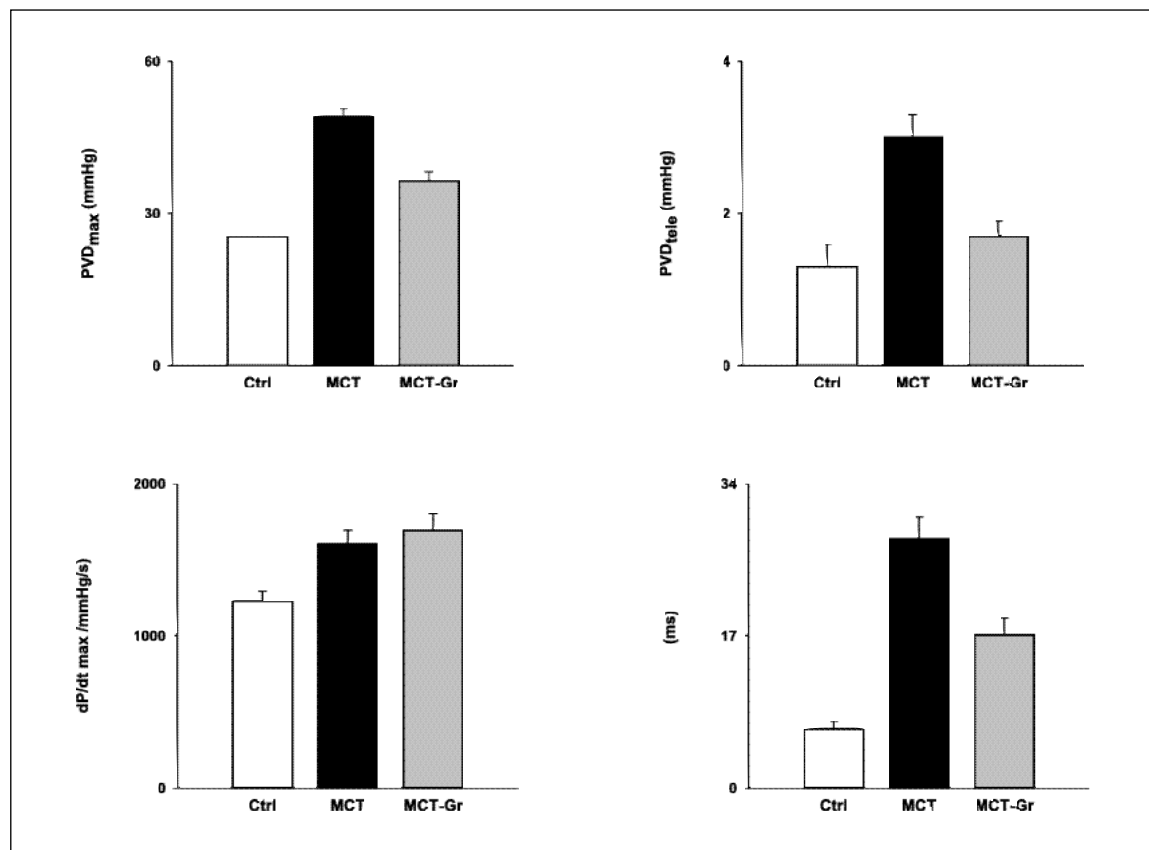
### Statistical analysis

The results are presented as means ± SEM and were analyzed using the one-way ANOVA test. When the groups presented statistically significant differences, the Student-Newman-Keuls test was used for multiple comparisons. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### Hemodynamic

The hemodynamic data are summarized in *Fig. 1*. Maximum RV systolic pressure (RVP<sub>max</sub>), which assesses degree of PHT, significantly increased in the MCT group, but decreased following treatment with ghrelin. This group also showed significant increases in dP/dt<sub>max</sub>, the time constant  $\tau$ , and RV end-diastolic pressure. Ghrelin reduced the effects of MCT on



*Fig. 1* Resultados Hemodinâmicos. Pressão sistólica máxima (PVD<sub>máx</sub>), velocidade máxima de elevação da pressão (dP/dt<sub>máx</sub>), pressão telediastólica (PVD<sub>tele</sub>) e constante de tempo tau ( $\tau$ ) ventricular direitos dos três grupos estudados (controle: Ctrl; monocrotalina: MCT; monocrotalina e grelina: MCT-Gr). \*  $p < 0,05$  vs Ctrl; †  $p < 0,05$  vs MCT.

*Fig. 1* Hemodynamic results. Right ventricular maximum systolic pressure (RVP<sub>máx</sub>), maximum velocity of pressure rise (dP/dt<sub>máx</sub>), end-diastolic pressure (endRVP) and time constant  $\tau$  in the three groups studied (control: Ctrl; monocrotaline: MCT; monocrotaline and ghrelin: MCT-Gr). \*  $p < 0.05$  vs. Ctrl; †  $p < 0.05$  vs. MCT.

(PVD<sub>máx</sub>), que avalia o grau de HTP, aumentou significativamente no grupo MCT, tendo sido atenuada após o tratamento com grelina. No grupo MCT também se verificou um aumento significativo do dP/dt<sub>máx</sub>, da constante de tempo  $\tau$  e das pressões telediastólicas VD. A grelina reduziu os efeitos da MCT sobre a velocidade de relaxamento (constante de tempo  $\tau$ ), a pressão telediastólica, mas não sobre o dP/dt<sub>máx</sub> VD.

### Estruturais

A sobrecarga crônica de pressão, secundária à HTP, resultou em hipertrofia do VD no grupo MCT. A hipertrofia do VD, expressa pela área da secção transversa dos miócitos do VD, foi atenuada pela grelina (*Fig. 2*).

As artérias pulmonares periféricas evidenciaram uma hipertrofia significativa da média no grupo MCT, a qual foi significativamente reduzida pela grelina, como ilustrado na *Fig. 2*.

relaxation rate (time constant  $\tau$ ) and end-diastolic pressure, but not on RV dP/dt<sub>máx</sub>.

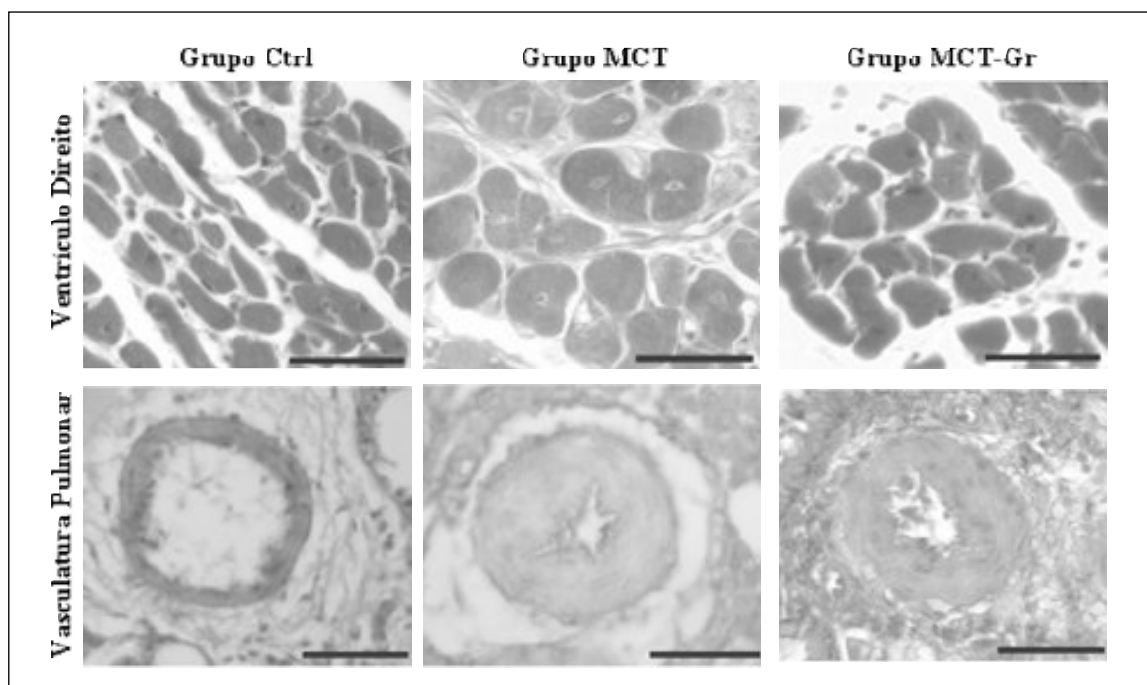
### Structural

Chronic pressure overload, secondary to PHT, resulted in RV hypertrophy in the MCT group but this, as determined by the area of the transverse section of RV myocytes, was attenuated by ghrelin (*Fig. 2*).

Peripheral pulmonary arteries showed significant medial hypertrophy in the MCT group, which was significantly attenuated by ghrelin, as can be seen from *Fig. 2*.

### Molecular

SERCA2a mRNA levels in the RV were significantly decreased in the MCT group, partly recovering in the group treated with ghrelin. Administration of MCT resulted in increased levels of ET-1 mRNA, an effect that was



*Fig. 2* Resultados Morfológicos. Fotografias de exemplos representativos das áreas transversas dos cardiomiócitos do ventrículo direito (em cima) e da espessura da parede das artérias musculares pulmonares periféricas (em baixo) dos três grupos estudados (controlo: Ctrl; monocrotalina: MCT; monocrotalina e grelina: MCT-Gr).

*Fig. 2* Morphological results. Photographs of representative examples of transverse sections of right ventricular cardiomyocytes (top) and of peripheral pulmonary muscle artery wall thickness (bottom) in the three groups studied (control: Ctrl; monocrotaline: MCT; monocrotaline and ghrelin: MCT-Ghr).

### Moleculares

Os níveis de ARNm de SERCA2a no VD estavam significativamente diminuídos no grupo MCT, tendo recuperado parcialmente no grupo tratado com grelina. A administração de MCT resultou num aumento dos níveis de ARNm de ET-1, efeito que foi revertido pela administração de grelina (*Fig. 3*).

### DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se que a redução da hipertensão pulmonar e a hipertrofia do VD induzidas pela grelina se acompanham de um aumento dos níveis miocárdicos de SERCA2a e de uma redução da activação neurohumoral da ET-1.

A grelina e o seu receptor expressam-se de forma marcada a nível pulmonar quer no período fetal quer durante a vida adulta<sup>(9)</sup> o que sugere que este peptídeo desempenha um papel importante na fisiologia normal do pulmão. Shimizu e col. demonstraram que a grelina melhora a disfunção endotelial e aumenta a expressão da síntese endotelial do óxido nítrico por uma via independente da HC<sup>(10)</sup>. Demonstrámos que a administração exógena de

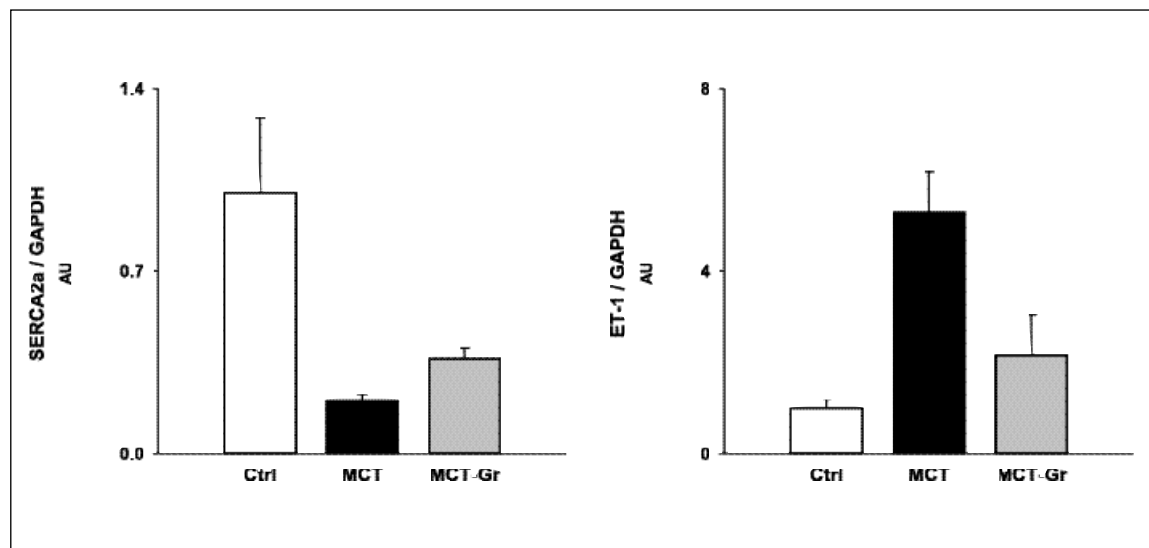
reverted by ghrelin (*Fig. 3*).

### DISCUSSION

This study demonstrated that ghrelin-induced reductions in pulmonary hypertension and RV hypertrophy are accompanied by increased myocardial levels of SERCA2a and reduced neurohumoral activation of ET-1.

Ghrelin and its receptor are expressed strongly in the fetal and adult lung<sup>(9)</sup>, which suggests that this peptide performs an important role in normal lung physiology. Shimizu et al. have shown that ghrelin improves endothelial function and increases expression of endothelial nitric oxide synthase through a growth hormone-independent mechanism<sup>(10)</sup>. We have demonstrated that exogenous administration of ghrelin has beneficial effects in pulmonary hypertension through mechanisms that appear to be independent of the GH/IGF-1 axis<sup>(5)</sup>.

In the heart, ghrelin improved right ventricular hemodynamic function and morphometric and molecular parameters. These effects can be attributed to reduction of RV afterload, as well



*Fig. 3* Resultados Moleculares. Níveis de ARNm de SERCA2a e de ET-1 normalizados para o GAPDH (housekeeping gene) e expressos em unidades arbitrárias (AU), dos três grupos estudados (controle: Ctrl; monocrotalina: MCT; monocrotalina e grelina: MCT-Gr). \*  $p < 0,05$  vs Ctrl; †  $p < 0,05$  vs MCT.

*Fig. 3* Molecular results. Levels of SERCA2a and ET-1 mRNA normalized for GAPDH (housekeeping gene), expressed in arbitrary units (AU), in the three groups studied (control: Ctrl; monocrotaline: MCT; monocrotaline and ghrelin: MCT-Gr). \*  $p < 0.05$  vs. Ctrl; †  $p < 0.05$  vs. MCT.

grelina exerce efeitos benéficos na hipertensão pulmonar por mecanismos que parecem ser independentes do eixo HC/IGF-1<sup>(5)</sup>.

A nível cardíaco, a grelina melhorou a função hemodinâmica ventricular direita e os parâmetros morfométricos e moleculares do VD. Estes efeitos podem ser atribuídos à redução da pós-carga VD bem como a ações miocárdicas da grelina. Uma redução da pós-carga VD irá favorecer primariamente uma recuperação da função e estrutura do VD. Os efeitos miocárdicos da grelina poderão ser mediados pelos GHSR ou pelo eixo HC/IGF1. De facto, Nagaya et al demonstraram que a administração crónica de grelina melhorou a disfunção do VE e atenuou a remodelagem do VE e a caquexia cardíaca em ratos com insuficiência cardíaca<sup>(2)</sup>. Recentemente, demonstrámos também que os níveis de ARNm de grelina se encontram aumentados no VD de animais tratados com MCT<sup>(5)</sup>. Por outro lado, o eixo HC/IGF1 aumenta a contractilidade miocárdica, diminui as resistências vasculares periféricas, induz hipertrofia miocárdica de tipo fisiológico e aumenta a expressão de SERCA2a na insuficiência cardíaca<sup>(1)</sup>.

A nível molecular, demonstrou-se que a sobrecarga do VD, secundária à HTP induzida pela MCT, se acompanha de uma redução da expressão génica de SERCA2a. A diminuição da

as ghrelin's myocardial action. Reducing RV afterload would primarily lead to functional and structural recovery of the ventricle. The myocardial effects of ghrelin may be mediated by GHSRs or by the GH/IGF-1 axis. Nagaya et al. demonstrated that the chronic administration of ghrelin improved left ventricular dysfunction and attenuated LV remodeling and cardiac cachexia in rats with heart failure<sup>(2)</sup>. We also showed recently that RV levels of ghrelin mRNA are increased in animals treated with MCT<sup>(5)</sup>. In addition, the GH/IGF-1 axis enhances myocardial contractile reserve, diminishes peripheral vascular resistance, induces myocardial physiological hypertrophy, and increases expression of SERCA2a in heart failure<sup>(1)</sup>.

At the molecular level, the present study showed that RV overload secondary to MCT-induced PHT is accompanied by reduced genetic expression of SERCA2a, which caused a marked decrease in relaxation velocity (increased  $\tau$ ); these effects were partly reversed by ghrelin. Ghrelin's attenuation of falls in SERCA2a mRNA levels may be due to one or more of the following factors: *i*) reduction of RV afterload secondary to the pulmonary effects of ghrelin; *ii*) activation of the GH/IGF-1 axis; or *iii*) stimulation of myocardial GHSRs. With regard

expressão de SERCA2a pela MCT foi acompanhada de uma marcada diminuição na velocidade de relaxamento (aumento do  $\tau$ ), efeitos que foram parcialmente revertidos pela grelina. Esta atenuação da redução dos níveis de ARNm de SERCA2a pela grelina poderá ser atribuída ao efeito de um ou mais dos seguintes factores: *i*) redução da pós-carga VD secundária aos efeitos pulmonares da grelina; *ii*) activação do eixo HC/IGF-1, ou *iii*) estimulação dos GHSR miocárdicos. Relativamente à modulação da ET-1 pela grelina, Wiley e col. sugeriram que a grelina pode exercer um antagonismo fisiológico ao efeito vasoconstritor da ET-1. Neste estudo pudemos constatar que a grelina atenua, de forma marcada, a expressão miocárdica de ET-1 que se encontra elevada na HTP. Este mecanismo poderá explicar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da grelina sobre a hipertrofia e os parâmetros hemodinâmicos do VD.

## CONCLUSÕES

A administração crónica de grelina

to ghrelin's modulation of endothelin-1, Wiley et al. suggested that ghrelin may be a physiological antagonist of its vasoconstrictor effect<sup>(4)</sup>. In the present study we found that ghrelin considerably reduces myocardial expression of ET-1, which is elevated in PHT. This mechanism may partly explain the beneficial effects of ghrelin on RV hypertrophy and hemodynamic parameters.

## CONCLUSIONS

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia, Faculdade de Medicina do Porto

Alameda Professor Hernâni Monteiro

4200-319 PORTO, PORTUGAL

e-mail: amoreira@med.up.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Tajima M, Weinberg EO, Bartunek J, et al. Treatment with growth hormone enhances contractile reserve and intracellular calcium transients in myocytes from rats with postinfarction heart failure. *Circulation* 1999;129:127-34.
2. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001;104:1430-5.
3. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001;280:R1483-R1487.
4. Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000;130:1146-52.
5. Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Roncon-Albuquerque R Jr., et al. Endogenous production of ghrelin and beneficial effects of its exogenous administration in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H2885-H2890.
6. Chen SJ, Chen YF, Meng QC, et al. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1995;79:2122-31.
7. Correia-Pinto J, Henriques-Coelho T, Oliveira SM, Leite-Moreira AF. Evaluation of biventricular function in the rat: a new experimental model. *Rev Port Cardiol.* 2002;21:1295-1302.
8. Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J. Load as an acute determinant of end-diastolic pressure-volume relation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H51-H59.
9. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1013-21.
10. Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y, et al. Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res*