

Efeitos Contrácteis da Grelina e Expressão do seu Receptor GHS-R1a no Miocárdio Normal e Hipertrófico [88]

JOÃO-BRUNO SOARES, AMÂNDIO ROCHA-SOUSA, PAULO CASTRO-CHAVES, TIAGO HENRIQUES-COELHO, ANDRÉ PEDRO LOURENÇO, ROBERTO RONCON-ALBUQUERQUE JR., ADELINO F. LEITE-MOREIRA
Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2005 ;24(10): 1235-1242

RESUMO

Introdução: A grelina, hormona descoberta em 1999, é o ligando endógeno do receptor dos secretagogos da hormona de crescimento (GHS-R1a). Estudos recentes sugerem que possa regular de forma importante a função do coração normal e insuficiente. No entanto, tem sido difícil distinguir os seus efeitos miocárdicos directos dos indirectos, secundários à libertação de hormona de crescimento e à acção vasomotora. Neste trabalho, estudámos os efeitos contrácteis da grelina e a expressão do seu receptor GHS-R1a no miocárdio normal e hipertrófico.

Métodos: Ratos Wistar adultos foram submetidos aleatoriamente a uma injeção sc de monocrotalina (MCT; n=9; 60 mg/kg) ou veículo (n=7; 1 ml/kg). Três semanas depois, após avaliação hemodinâmica do ventrículo direito (VD), procedeu-se à colheita de amostras da parede livre do VD e à dissecação dos músculos papilares do mesmo ventrículo.

Os efeitos miocárdicos da grelina foram avaliados em músculos papilares do VD de ratos normais (n=7) e injectados com MCT (n=9), pela adição de um fragmento activo da grelina (fG, 10^{-6} M) à solução superfusora.

A expressão de ARNm do GHS-R1a foi determinada em amostras da parede livre do VD de ratos normais (n=7) e injectados com MCT (n=9) por real time RT-PCR.

Resultados: No grupo Normal, o fG provocou uma redução de $27,9 \pm 4,0$ % da tensão activa (TA), de $28,5 \pm 6,7$ % da velocidade máxima de contracção (dT/dt_{max}) e de $21,4 \pm 4,2$ % da velocidade máxima de relaxamento (dT/dt_{min}). No grupo MCT, o fG provocou uma redução

ABSTRACT

Contractile Effects of Ghrelin and Expression of its Receptor GHS-R1a in Normal and Hypertrophic Myocardium

Introduction: Ghrelin, isolated in 1999, is an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a). Recent studies suggest that it may influence the function of normal and failing hearts. Nonetheless, it has been difficult to differentiate its effects on the intrinsic properties of the myocardium from the secondary effects resulting from growth hormone release and vasomotor action. This study investigated the contractile effects of ghrelin and expression of its receptor GHS-R1a in normal and hypertrophic myocardium.

Methods: Adult Wistar rats randomly received monocrotaline (MCT; n=9; 60 mg/kg, sc) or vehicle (n=7; 1 ml/kg). Three weeks later, after right ventricular (RV) hemodynamic evaluation, the effects of 10^{-6} M of a pentapeptide active fragment of ghrelin (fG) were tested on contractile parameters of RV papillary muscles (Normal, n=7; MCT, n=9). GHS-R1a mRNA expression was estimated in RV transmural free-wall samples (Normal, n=7; MCT, n=9), using real-time RT-PCR.

Results: In the Normal group, fG reduced active tension (AT), maximum velocity of tension rise (dT/dt_{max}) and maximum velocity of tension decline (dT/dt_{min}), by 27.9 ± 4.0 %, 28.5 ± 6.7 % and 21.4 ± 4.2 % respectively. In the MCT group, fG reduced AT, dT/dt_{max} and dT/dt_{min} , by 24.1 ± 6.3 %, 24.3 ± 6.5 % and 24.5 ± 6.1 % respectively. GHS-R1a mRNA

de $24,1 \pm 6,3$ % da TA, de $24,3 \pm 6,5$ % da dT/dt_{max} e de $24,5 \pm 6,1$ % da dT/dt_{min} .

A expressão do receptor da grelina foi semelhante nos dois grupos (Normal: $2,3 \cdot 10^5 \pm 5,4 \cdot 10^4$; MCT: $3,0 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^5$; $p > 0,05$).

Conclusão: Demonstrámos que a grelina tem efeitos inotrópico e lusitropico negativos no miocárdio normal, que se encontram preservados, à semelhança da expressão do seu receptor, na hipertrofia ventricular direita, sugerindo a sua potencial utilização como novo alvo terapêutico no contexto da progressão para a insuficiência cardíaca.

Palavras-Chave

Grelina; GHS-R1a; Miocárdio; Hipertrofia

expression was similar in the two groups (Normal: $2.3 \cdot 10^5 \pm 5.4 \cdot 10^4$; MCT: $3.0 \cdot 10^5 \pm 1.1 \cdot 10^5$; $p > 0.05$).

Conclusion: This study shows that ghrelin has negative inotropic and lusitropic effects. These effects and expression of its receptor are preserved in RV hypertrophy, suggesting that ghrelin may be a new target in progression to heart failure.

Key words

Ghrelin; GHS-R1a; Myocardium; Hypertrophy

INTRODUÇÃO

A grelina é um peptídeo formado por 28 aminoácidos (aa), com um grupo acilo ligado ao terceiro a.a (Ser), e produzido fundamentalmente pelo estômago⁽¹⁾. Foi, recentemente, identificada como o ligando endógeno do receptor dos secretagogos da hormona de crescimento (GHS-R1a)⁽¹⁾. Este receptor é expresso essencialmente na hipófise e hipotálamo e é responsável pela secreção da hormona de crescimento (HC) induzida pela grelina^(1,2).

Estudos recentes demonstraram a expressão de ARNm de grelina e GHS-R1a a nível do coração, sugerindo que a grelina possa influenciar a função cardíaca, independentemente da libertação de HC⁽²⁾. Essa hipótese foi já confirmada em estudos subsequentes. Em voluntários saudáveis e doentes com insuficiência cardíaca (IC), a administração de grelina diminuiu a resistência vascular periférica e aumentou o débito cardíaco, sem alteração significativa da frequência cardíaca⁽³⁾. Em doentes com IC, a administração repetida de grelina melhorou a função do ventrículo esquerdo e a capacidade de exercício e diminuiu a atrofia muscular⁽⁴⁾. A administração repetida de grelina atenuou também a hipertensão pulmonar e a hipertrofia do ventrículo direito (VD) em ratos com hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina (MCT)⁽⁵⁾.

Relativamente à modulação da função miocárdica pela grelina, tem sido difícil distinguir

INTRODUCTION

Ghrelin is a peptide consisting of 28 amino acids (aa), with an acyl group attached to the third aa (serine), and produced mainly in the stomach⁽¹⁾. It was recently identified as the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a)⁽¹⁾. This receptor is mainly expressed in the pituitary gland and hypothalamus and is responsible for secretion of growth hormone (GH) induced by ghrelin^(1,2).

Recent studies have shown expression of mRNA of ghrelin and GHS-R1a in the heart, suggesting that ghrelin may influence cardiac function, independently of GH release⁽²⁾, a hypothesis that has been confirmed in subsequent studies. In healthy volunteers and patients with heart failure (HF), administration of ghrelin reduced peripheral vascular resistance and increased cardiac output, with no significant change in heart rate⁽³⁾. In HF patients, repeated administration of ghrelin improved left ventricular function and exercise capacity and reduced muscular atrophy⁽⁴⁾. Repeated administration has also been shown to reduce pulmonary hypertension and right ventricular (RV) hypertrophy in rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline (MCT)⁽⁵⁾.

With regard to the modulating effect of ghrelin on myocardial function, it has been difficult to differentiate its effects on the intrinsic properties of the myocardium from the secondary effects resulting from GH release and vasomo-

os seus efeitos directos dos indirectos, secundários à libertação de HC e à acção vasomotora (vasodilatação sistémica e vasoconstricção coronária)^(1,6,7). Recentemente, um estudo atribuiu à grelina uma acção inotrópica negativa sobre o miocárdio normal⁽⁸⁾. Quanto aos efeitos contrácteis da grelina sobre o miocárdio hipertrófico, não existe qualquer estudo.

No presente trabalho, estudámos os efeitos contrácteis directos da grelina e a expressão do seu receptor no miocárdio normal e hipertrófico.

MATERIAL E MÉTODOS

A experimentação animal foi realizada de acordo com a Lei Portuguesa para o bem-estar animal. Foram utilizados machos de ratos Wistar adultos.

Modelo experimental de hipertrofia ventricular direita (VD)

Para obtermos hipertrofia VD utilizámos o modelo da hipertensão pulmonar induzida pela MCT⁽⁹⁾.

Os animais receberam aleatoriamente uma injeção sc de MCT (n=9, 60 mg/kg) ou volume idêntico de veículo (n=7, 1 ml/kg). Três semanas depois, foram sujeitos a uma avaliação hemodinâmica do VD.

Resumidamente, os animais foram anestesiados com pentobarbital, traqueostomizados para ventilação mecânica e cateterizados na veia jugular direita, sob visualização microscópica. Procedeu-se depois a uma esternotomia mediana e pericardiotomia para exposição do coração. De seguida introduziu-se um micromanómetro de pressões na cavidade VD para avaliação hemodinâmica. Foram analisados os seguintes parâmetros: pressão telediastólica (P_{TD}), pressão sistólica máxima (P_{max}), velocidades máximas de subida (dP/dt_{max}) e de queda (dP/dt_{min}) de pressão e constante de tempo do relaxamento isovolumétrico tau (τ).

Após a colecção dos dados hemodinâmicos, procedeu-se a cardiectomia para colheita de amostras da parede livre do VD e dissecação dos músculos papilares do mesmo ventrículo.

Efeitos miocárdicos da grelina

Os músculos papilares (Grupo Normal, n=7; Grupo MCT, n=9) foram colocados num banho de 10 mL contendo uma solução de Tyrodes

tor action (systemic vasodilation and coronary vasoconstriction)^(1,6,7). In a recent study, ghrelin was shown to have a negative inotropic action on normal myocardium⁽⁸⁾. There have been no studies of its contractile effects on hypertrophic myocardium.

The present study investigated the direct contractile effects of ghrelin and expression of its receptor in normal and hypertrophic myocardium.

METHODS

The animal experiment was conducted in accordance with Portuguese animal welfare law and used adult male Wistar rats.

Experimental model of right ventricular hypertrophy (RV)

Monocrotaline-induced pulmonary hypertension was used to model RV hypertrophy⁽⁹⁾.

The animals randomly received a subcutaneous injection of MCT (n=9, 60 mg/kg) or a similar volume of vehicle (n=7, 1 ml/kg). Three weeks later, they underwent RV hemodynamic evaluation.

The animals were anesthetized with pentobarbital, tracheotomized for mechanical ventilation and the right jugular vein catheterized under microscopic visualization. Median sternotomy and pericardiotomy were performed to expose the heart, and a pressure micromanometer was then inserted into the RV for hemodynamic evaluation. The following parameters were determined: end-diastolic pressure (P_{ED}), maximum systolic pressure (P_{max}), maximum velocity of pressure rise (dP/dt_{max}) and decline (dP/dt_{min}) and isovolumetric relaxation time (τ).

Following collection of hemodynamic data, a cardiectomy was performed to collect samples of the RV free wall, as well as dissection of the RV papillary muscles.

Myocardial effects of ghrelin

The papillary muscles (Normal group, n=7; MCT group, n=9) were placed in a 10 mL bath containing a modified Tyrode solution (in mM: NaCl 120, KCl 5.4, MgCl₂ 1.05, NaH₂PO₄ 0.42, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 22.6, glucose 5, ascorbic acid 0.28, EDTA 0.05 and atenolol 0.02), at 35 °C, together with a cardioplegic agent (BDM, 3%) and bovine serum (5%), in equilibrium with 95% CO₂ and 5% O₂ to maintain pH between 7.36 and 7.42. After connecting the mus-

modificada (em mM: NaCl 120, KCl 5.4, MgCl₂ 1.05, NaH₂PO₄ 0.42, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 22.6, Glucose 5, Ascorbic acid 0.28, EDTA 0.05 e Atenolol 0.02), a 35°C, com uma substância cardioplégica (BDM, 3%) e soro de vitelo (5%) e em equilíbrio com 95% de CO₂ e 5% de O₂ de modo a manter o pH entre 7.36 e 7.42. Após conexão dos músculos a um transdutor isométrico/isotônico, foi determinada a pré-carga com base nas dimensões dos músculos e fixada a frequência de estimulação em 1Hz. Vinte minutos depois, a solução superfusora foi substituída por uma solução semelhante, sem BDM. Uma hora após, a solução foi novamente substituída, agora por uma sem soro de vitelo. Após a determinação do L_{max} e a obtenção de 2 contrações isométricas e isotônicas sobreponíveis, foi iniciado o protocolo experimental. Este consistiu na adição, à solução superfusora, de um fragmento activo da grelina (fG, *Peptides International*), de modo a obter no banho uma concentração de 10⁻⁶ M, com registo subsequente da *performance* muscular. Os parâmetros analisados incluíram a tensão activa (TA) e as velocidades máximas de subida (dT/dt_{max}) e de queda (dT/dt_{min}) da tensão muscular. Os dois primeiros permitiram-nos avaliar os efeitos inotrópicos e o último os efeitos lusitropicos (sobre o relaxamento) da grelina.

Expressão de ARNm do GHS-R1a

Os níveis de ARNm de GHS-R1a foram quantificados em amostras da parede livre do VD de ratos dos grupos Normal (n=7) e MCT (n=9) por Real-Time RT-PCR. Esta metodologia foi descrita de forma mais pormenorizada em estudo prévio⁽⁶⁾. Os *primers* utilizados são apresentados no *Quadro I*.

Análise estatística

Os valores são apresentados como média ± erro padrão em termos absolutos ou como percentagem de variação em relação ao controlo

Quadro I
Sequência nucleotídica dos primers usados no Real Time RT-PCR

Primer	Sequência
Reverse	5'-AGG AAA GTA CAG GGA CCA G-3'
Forward	5'-CAC CCA GAG GAC AGA GGA CAA-3'
Forward-standard	5'-GCG AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CAC CCA GAG GAC AGA GGA CAA GGC ATC AAG CTG TCA GGA-3'

cles to an isometric/isotonic transducer, preload was determined based on their size and the stimulation frequency fixed at 1 Hz. Twenty minutes later, the superfusion solution was replaced with one of a similar composition but without BDM. After an hour, the solution was again replaced, this time with one without bovine serum. After determining L_{max} and obtaining two similar isometric and isotonic contractions, the experimental protocol was begun. This consisted of adding an active fragment of ghrelin (fG, *Peptides International*) to the solution, to obtain a concentration of 10⁻⁶ M in the bath, and subsequent recording of muscle performance. The parameters analyzed included active tension (AT) and maximum velocity of tension rise (dT/dt_{max}) and tension decline (dT/dt_{min}). The first two parameters were used to assess the inotropic effects of ghrelin, and the third its lusitropic (relaxation) effects.

GHS-R1a mRNA expression

Levels of GHS-R1a mRNA were estimated in RV transmural free-wall samples in the Normal group (n=7) and MCT group (n=9) by real-time RT-PCR. The methodology has been described in detail in a previous study⁽⁶⁾. The primers used are given in *Table I*.

Statistical analysis

Values are presented as means ± standard error in absolute terms or as the percentage of variation from the controls (when indicated). The groups were compared using the unpaired Student's t test. Differences were considered significant when p<0.05.

RESULTS

Experimental model of RV hypertrophy

The results of right ventricular morphometric and hemodynamic evaluation are shown in *Table II*. The MCT group presented higher RV

Table I
Nucleotide sequence of primers used in real-time RT-PCR

Primer	Sequence
Reverse	5'-AGG AAA GTA CAG GGA CCA G-3'
Forward	5'-CAC CCA GAG GAC AGA GGA CAA-3'
Forward-standard	5'-GCG AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CAC CCA GAG GAC AGA GGA CAA GGC ATC AAG CTG TCA GGA-3'

Quadro II

Avaliação morfométrica e hemodinâmica do ventrículo direito nos grupos Normal e MCT

Parâmetro	Grupo Normal	Grupo MCT
Peso VD/Peso VE + Septo (g/g)	0,21 ± 0,01	0,58 ± 0,03*
Peso VD/Peso Corporal (g/kg)	0,38 ± 0,02	1,18 ± 0,07*
P _{TD} (mmHg)	1,1 ± 0,3	3,2 ± 0,3*
P _{max} (mmHg)	24,6 ± 1,8	49,4 ± 1,7*
dP/dt _{max} (mmHg/s)	1227 ± 80	1616 ± 102*
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-909 ± 110	-1088 ± 59
τ (ms)	7 ± 1	28 ± 3*

VD: Ventrículo Direito; VE: Ventrículo Esquerdo; MCT: Monocrotalina; P_{TD}: Pressão Telediastólica; P_{max}: Pressão Sistólica Máxima; dP/dt_{max}: Velocidade Máxima de Subida da Pressão; dP/dt_{min}: Velocidade Máxima de Queda da Pressão; e τ: Constante de Tempo de Relaxamento Isovolumétrico Tau. Valores apresentados como Média ± Erro Padrão. * p < 0,05; MCT vs Normal.

(quando indicado). A comparação dos grupos foi feita com um teste *t* não emparelhado. As diferenças foram consideradas significativas quando p < 0,05.

RESULTADOS

Modelo experimental de hipertrofia VD

Os resultados referentes à avaliação morfométrica e hemodinâmica do VD são apresentados no Quadro II. O grupo MCT apresentou maiores relações Peso VD/Peso VE + Septo e Peso VD/Peso Corporal. Quando comparado com o grupo Normal, o grupo MCT apresentou também maiores P_{TD}, P_{max}, dP/dt_{max} e constante de tempo de relaxamento isovolumétrico tau (τ). Não se registaram diferenças significativas relativamente à dP/dt_{min}.

Efeitos miocárdicos da grelina

A função miocárdica basal e a caracterização morfológica dos músculos papilares utilizados são apresentadas no Quadro III. Apesar das diferenças não serem significativas, observou-

Quadro III

Caracterização morfológica e contráctil dos músculos papilares dos grupos Normal e MCT

Parâmetro	Grupo Normal	Grupo MCT
n	7	9
Comprimento (mm)	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3
Peso (mg)	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,4
Pré-carga (mN)	3,0 ± 1,1	3,3 ± 0,7
TA (mN/mm ²)	11,2 ± 1,5	18,7 ± 3,9
dT/dt _{max} (mN/mm ² /s)	179,7 ± 25,0	292,7 ± 54,2
dT/dt _{min} (mN/mm ² /s)	-142,2 ± 22,5	-206,3 ± 37,8

MCT: Monocrotalina; TA: Tensão Activa; dT/dt_{max}, dT/dt_{min}: Velocidades Máximas de Subida e de Queda da Tensão, respectivamente. Valores apresentados como Média ± Erro Padrão.

Table II

Right ventricular morphometric and hemodynamic evaluation in Normal and MCT groups

Parameter	Normal group	MCT group
RV weight/LV weight + septum (g/g)	0.21 ± 0.01	0.58 ± 0.03*
RV weight/body weight (g/kg)	0.38 ± 0.02	1.18 ± 0.07*
P _{ED} (mmHg)	1.1 ± 0.3	3.2 ± 0.3*
P _{max} (mmHg)	24.6 ± 1.8	49.4 ± 1.7*
dP/dt _{max} (mmHg/s)	1227 ± 80	1616 ± 102*
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-909 ± 110	-1088 ± 59
τ (ms)	7 ± 1	28 ± 3*

RV: Right ventricle; LV: Left ventricle; MCT: Monocrotaline; P_{ED}: End-diastolic pressure; P_{max}: Maximum systolic pressure; dP/dt_{max}: Maximum velocity of pressure rise; dP/dt_{min}: Maximum velocity of pressure decline; τ: Isovolumetric relaxation time. Values presented as means ± standard error. * p < 0.05; MCT vs. Normal.

weight/LV weight + septum and RV weight/body weight ratios, as well as higher P_{ED}, P_{max}, dP/dt_{max} and isovolumetric relaxation time (τ). There were no significant differences with regard to dP/dt_{min}.

Myocardial effects of ghrelin

Baseline myocardial function and morphological characteristics of the papillary muscles used are presented in Table III. Although the differences were not significant, there was a tendency for increased AT, dT/dt_{max} and dT/dt_{min} in the MCT group compared to the Normal group.

In the papillary muscles of the Normal group, fG induced negative inotropic and lusitropic effects (Fig. 1), reducing AT, dT/dt_{max} and dT/dt_{min}, by 27.9 ± 4.0 %, 28.5 ± 6.7 % and 21.4 ± 4.2 % respectively compared to the controls (Fig. 1).

In the MCT group, the fG-induced reduction in AT, dT/dt_{max} and dT/dt_{min} (respectively 24.1 ± 6.3 %, 24.3 ± 6.5 % and 24.5 ± 6.1 %) was not statistically different from that found in the Normal group (Fig. 1).

Table III

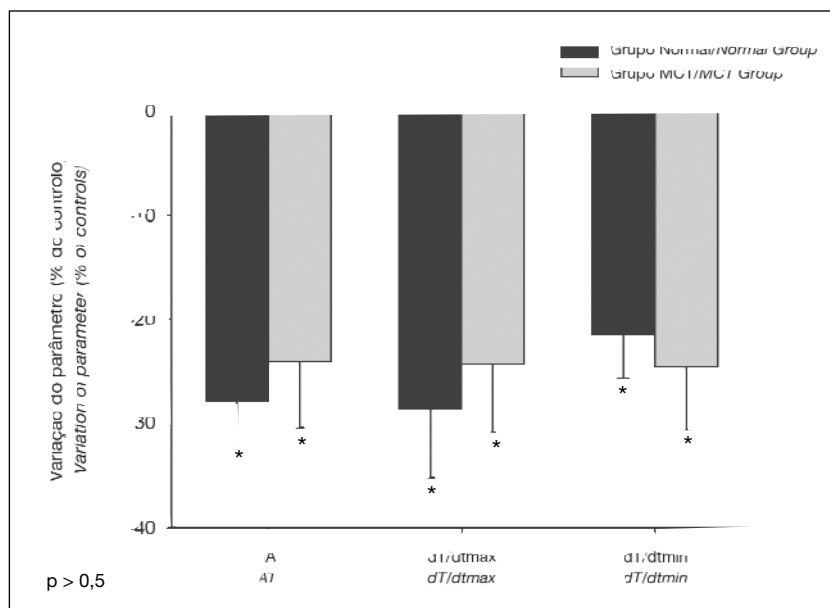
Morphological and contractile characteristics of papillary muscles in Normal and MCT groups

Parameter	Normal group	MCT group
n	7	9
Length (mm)	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.3
Weight (mg)	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.4
Preload (mN)	3.0 ± 1.1	3.3 ± 0.7
AT (mN/mm ²)	11.2 ± 1.5	18.7 ± 3.9
dT/dt _{max} (mN/mm ² /s)	179.7 ± 25.0	292.7 ± 54.2
dT/dt _{min} (mN/mm ² /s)	-142.2 ± 22.5	-206.3 ± 37.8

MCT: Monocrotaline; AT: Active tension; dT/dt_{max}, dT/dt_{min}: Maximum velocities of tension rise and decline respectively. Values presented as means ± standard error.

Fig. 1 Efeitos miocárdicos do fG (10^{-6} M) nos grupos Normal e MCT. fG: Fragmento Activo da Grelina; MCT: Monocrotalina; TA, Tensão Activa; dT/dt_{max} , dT/dt_{min} , Velocidades Máximas de Subida e de Queda da Tensão, respectivamente. Valores apresentados como Média \pm Erro Padrão da percentagem de variação em relação ao controlo. $p < 0,05$: * vs controlo.

Fig. 1 Myocardial effects of fG (10^{-6} M) in Normal and MCT groups. fG: Active fragment of ghrelin; MCT: Monocrotaline; AT: Active tension; dT/dt_{max} , dT/dt_{min} : Maximum velocities of tension rise and decline respectively. Values presented as means \pm standard error of the percentage variation compared to the controls. $p < 0,05$: MCT * vs. controls.



-se uma tendência para o aumento da TA, dT/dt_{max} e dT/dt_{min} no grupo MCT, comparativamente ao grupo Normal.

Nos músculos papilares do grupo Normal, o fG induziu efeitos inotrópico e lusitrópico negativos (Fig. 1). A adição de fG produziu uma diminuição da TA, dT/dt_{max} e dT/dt_{min} , respectivamente, de 27,9 \pm 4,0 %, 28,5 \pm 6,7% e 21,4 \pm 4,2 %, relativamente ao controlo (Fig. 1).

Nos músculos papilares do grupo MCT, a diminuição da TA, dT/dt_{max} e dT/dt_{min} (respectivamente, 24,1 \pm 6,3 %, 24,3 \pm 6,5 % e 24,5 \pm 6,1 %) induzida pelo fG não foi estatisticamente diferente da observada no grupo Normal (Fig. 1).

Expressão de ARNm do GHS-R1a

Foi detectada a expressão de ARNm do GHS-R1a nos grupos Normal e MCT. O nível dessa expressão não diferiu significativamente entre os grupos Normal (2,3*10⁵ \pm 5,4*10⁴) e MCT (3,0*10⁵ \pm 1,1*10⁵).

DISCUSSÃO

A fracção activa da grelina é formada apenas pelos primeiros quatro a.a. Uma vez que o fragmento que utilizámos é formado pelos cinco primeiros a.a, os resultados obtidos serão idênticos aos obtidos com o peptídeo completo (5, 10).

Com o presente trabalho demonstrámos que a grelina é capaz de regular de forma directa (isto é, independente da libertação de HC e da acção vasomotora) e aguda a função sistólica e diastólica do miocárdio, exercendo sobre este

GHS-R1a mRNA expression

GHS-R1a mRNA expression was found in both groups, its level not differing significantly between the Normal group (2.3*10⁵ \pm 5.4*10⁴) and the MCT group (3.0*10⁵ \pm 1.1*10⁵).

DISCUSSION

The active fragment of ghrelin consists of the first four aa only. Since the fragment we used was formed of the first five aa, the results were the same as would be obtained with the complete peptide (5, 10).

The present study has shown that ghrelin is able to regulate myocardial systolic and diastolic function directly (i.e. independently of GH release and vasomotor action) and acutely, producing negative inotropic and lusitropic effects. This conclusion is possible since the study was performed in isolated cardiac muscle preparations, which removed any influence on myocardial function of ghrelin-induced GH release and vasomotor action (systemic vasodilation and coronary vasoconstriction) (1, 6, 7). These results confirm the negative inotropic and lusitropic effects suggested by a previous study (8), but appear to be in disagreement with *in vivo* studies, in which administration of ghrelin increased cardiac index (3, 4). However, in those studies, this effect may have been the result of ghrelin-induced GH release and systemic vasodilation (with consequent reduction in afterload) rather than a direct effect of ghrelin on the myocardium.

efeitos inotrópico e lusitrópico negativos. Tal conclusão é possível porque o estudo foi levado a cabo em preparações de músculo cardíaco isolado, o que permite retirar a influência, sobre a função miocárdica, da libertação de HC e efeitos vasomotores (vasodilatação sistémica e vasoconstrição coronária) provocados pela grelina^(1, 6, 7). Estes resultados confirmam os efeitos inotrópico e lusitrópicos negativos sugeridos por um estudo prévio⁽⁸⁾, mas está em aparente desacordo com estudos *in vivo*, nos quais a administração de grelina produziu um aumento do índice cardíaco^(3, 4). No entanto, nestes estudos, este efeito poderá ser consequência da libertação de HC e da vasodilatação sistémica (com consequente diminuição da pós-carga) provocadas pela grelina e não um efeito directo da grelina sobre o miocárdio.

Se em relação aos efeitos da grelina no miocárdio normal havia já um estudo que sugeria os efeitos por nós confirmados, relativamente aos efeitos da grelina no miocárdio hipertrofico, o nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar que os efeitos inotrópico e lusitrópico negativos da grelina estão preservados no miocárdio hipertrofico. A avaliação dos efeitos contrácteis da grelina no miocárdio hipertrofico foi feita utilizando músculos papilares de ratos injectados com MCT. O modelo experimental de hipertensão pulmonar induzida pela MCT é um modelo reprodutível de hipertrofia VD⁽⁹⁾. Os resultados da análise morfológica e hemodinâmica do VD confirmaram a presença de hipertrofia VD no grupo MCT.

A quantificação do ARNm do receptor da grelina GHS-R1a, permitiu-nos confirmar a expressão de ARNm desse receptor no miocárdio normal⁽²⁾ e, pela primeira vez, demonstrar que essa expressão se mantém no miocárdio hipertrofico, isto é, que uma das vias de sinalização da grelina está preservada na progressão para a insuficiência cardíaca.

Os resultados deste estudo demonstram assim que quer os efeitos miocárdicos da grelina, quer uma das suas vias de sinalização (GHS-R1a) estão preservados no miocárdio hipertrofico, sugerindo o seu potencial interesse como novos alvos terapêuticos no contexto da progressão para a insuficiência cardíaca.

AGRADECIMENTOS

Trabalho subsidiado pelos Projectos n.º POCTI/CBO/47519/02 e n.º POCTI/SAU-FCF/60803/2004, através da Unidade I&D Cardiovascular n.º 51/94 da FCT.

While there had been one previous study on the effects of ghrelin on normal myocardium that suggested the results obtained by us, ours was the first study to demonstrate that the negative inotropic and lusitropic effects of ghrelin are preserved in hypertrophic myocardium. Assessment of the contractile effects of ghrelin in hypertrophic myocardium was carried out using the papillary muscles of rats injected with MCT, MCT-induced pulmonary hypertension being a reproducible model of RV hypertrophy⁽⁹⁾. The results of right ventricular morphometric and hemodynamic analysis confirmed the presence of RV hypertrophy in the MCT group.

Quantification of the mRNA of the ghrelin receptor GHS-R1a confirmed its expression in normal myocardium⁽²⁾ and demonstrated, for the first time, that this expression is maintained in hypertrophic myocardium; this means that one of the signaling pathways of ghrelin is preserved in progression to heart failure.

The study's results thus show that the myocardial effects of ghrelin and one of its signaling pathways (GHS-R1a) are preserved in hypertrophic myocardium, suggesting that ghrelin may be a new therapeutic target in progression to heart failure.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by projects no. POCTI/CBO/47519/02 and no. POCTI/SAU-FCF/60803/2004, through the Cardiovascular R&D Unit (51/94) of the Foundation for Science and Technology.

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

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60.
2. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2988.
3. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:1483-7.
4. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H et al. Hemodynamic, renal and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;186:5854-9.
5. Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Roncon-Albuquerque R Jr, Baptista MJ, Lourenço AP, Oliveira SM 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:H2885-90.
6. Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2002;136:1146-52.
7. Pemberton CJ, Tokola H, Bagi Z, Koller A, Pontinen J, Ola A et al. Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1522-9.
8. Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghé C et al. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol* 2003;476:87-95.
9. Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1989;256:H1328-36.
10. Bednarek M, Feighener S, Pong S, McKee K, Hreniuk D, Silva M et al. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2001;43:4370-6.

The Netherlands First European Course on 3D Echocardiography

May 11-12, 2006

GOLDEN TULLIP HOTEL INNTEL

ROTTERDAM, THE NETHERLANDS