



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**PAPEL DA GRELINA E DO RECEPTOR GHS-R1a NO CONTROLE DA  
FUNÇÃO RENAL E HEMODINÂMICA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E  
HIPERTENSOS**

**ELDER SALES DA SILVA**

**GOIÂNIA-GO  
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS  
DE TESES E  
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     Dissertação     Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

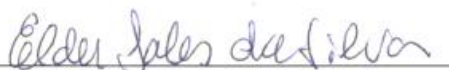
Nome completo do autor: Elder Sales da Silva

Título do trabalho: PAPEL DA GRELINA E DO RECEPTOR GHS-R1a NO CONTROLE DA FUNÇÃO RENAL E HEMODINÂMICA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

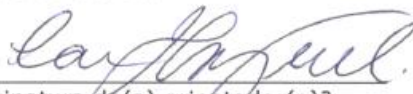
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio  
Subcoordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
ICB - UFG - Mat. Siere 1908997

Data: 13 / 04 / 2019

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**ELDER SALES DA SILVA**

**PAPEL DA GRELINA E DO RECEPTOR GHS-R1a NO CONTROLE DA  
FUNÇÃO RENAL E HEMODINÂMICA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E  
HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas vinculada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas  
Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira  
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio

**GOIÂNIA-GO**

**2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sales-Silva, Elder Sales da Silva  
PAPEL DA GRELINA E DO RECEPTOR GHS-R1a NO  
CONTROLE DA FUNÇÃO RENAL E HEMODINÂMICA EM ANIMAIS  
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS [manuscrito] / Elder Sales da  
Silva Sales-Silva. - 2019.  
XCIII, 113 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira Nassar Ferreira;  
co-orientador Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio Xavier .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Grelina. 2. receptores GHS-R1a. 3. interação grelina-GHS-R1a.  
4. função renal. 5. hemodinâmica. I. Nassar Ferreira, Reginaldo Nassar  
Ferreira, orient. II. Título.

CDU 612



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 3**

1  
2 Aos catorze dias do mês de março do ano de dois mil e dezenove, às nove  
3 horas, no Anfiteatro do ICB II da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se  
4 os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira,  
5 Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio, Profa. Dra. Patricia Maria Ferreira,  
6 Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes, Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gingozac e  
7 Profa. Dra. Lilian Fernanda Pacheco para, em sessão pública presidida pelo  
8 primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de tese  
9 intitulada "PAPEL DA GRELINA E DO RECEPTOR GHS-R1a NO CONTROLE DA  
10 FUNÇÃO RENAL E HEMODINÂMICA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E  
11 HIPERTENSOS", em nível de doutorado, de autoria de **Elder Sales da Silva**,  
12 discente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
13 da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez  
14 a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi  
15 concedida ao autor da tese que, em cerca de 50 minutos, procedeu à  
16 apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da  
17 banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial.  
18 Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em  
19 vista o que consta na Resolução nº1558 de maio de 2017 do Conselho de  
20 Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa  
21 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a tese foi  
22 aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito  
23 para fins de obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pela  
24 Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da  
25 entrega da versão definitiva da tese na secretaria do programa, com as  
26 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

27 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta,  
28 às 13 horas e 10 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para  
29 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da  
30 Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da  
31 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,  
32 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual  
33 teor.

34

  
**Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira**

Presidente da Banca

35

36

Universidade Federal de Goiás

37

38

  
**Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio**

39

40

Universidade Federal de Goiás

41

42

  
**Profa. Dra. Patrícia Maria Ferreira**

43

44

Universidade Federal de Goiás

45

46

  
**Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gingozac**

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

47

48

  
**Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes**

49

50

Universidade Federal de Goiás

51

  
**Profa. Dra. Lilian Fernanda Pacheco**

52

Universidade Estadual de Goiás

“Um dia me disseram que as nuvens não eram de algodão (...). Sem querer eles me deram as chaves que abrem esta prisão! E tudo ficou tão claro, um intervalo na escuridão. Uma estrela de brilho raro, um disparo para um coração (...). Sonhos que podemos ter! Somos quem podemos ser” (Engenheiros do Hawaii).

## Dedicatória

Impossível não contemplar neste momento tão importante quem conduz o universo e que, por um passe mágico da sua construção, criou aqueles que me criaram e todos que criaram todos, como identificação com o criador, talvez, respeitadas as limitações humanas, o que fazemos de sublime: A criação! Obrigado pelo ar que respiro, pelo alimento que nos move e pela consciência concedida assim com a própria vida! Obrigado eternamente.

Beatriz Divina Sales, mãe, minha estrela de brilho raro, me fez físico, homem, caráter, honestidade misturadas à admiração e amor mesmo sabendo da condição humana, me fez acreditar na luta que é manter essas integridades diante das suscetibilidades. Enoque Sales da Silva, pai, um modelo de sustentação material e que me ensinou a cuidar das coisas, da casa e da vida. Aos meus amados irmãos: Jane, Eliane e Marcelo (ordem cronológica).

Juliana Rodriguez de Sena, guerreira que entre a privação presencial de um marido cientista tardio, acompanhou e “companheirou” essa grande jornada, mostrando amor e compreensão. Aos filhos, Isabella e Arthur, como cada passo ou sono perdido me impulsionaram a ver um mundo melhor pra nós todos, com vocês entendi o que é amar neurovegetativamente além da razão cortical.

## **Agradecimentos**

Realmente foi uma grande viagem, entrei num ambiente que já tinha certas ferramentas cognitivas para a luta. Mas, me senti menino de novo! Fui aceito, abraçado, conduzido, puxaram minha orelha nas horas certas, me motivaram e me compreenderam me encorajaram!!! Mestres na honradez de saber que educação e formação passam, primeiro, pelo coração e depois passa pela mente ou pela razão como queiram. Aos grandes mestres Dr. Reginaldo Nassar e Dr. Carlos Xavier... Obrigado! Vocês me mostraram que ao entrar numa jornada como essa não precisava sair tão excepcional, mas não poderia sair com entrei e isso é fato. Obrigado por me ajudar a mudar de faixa, mas saber que continuamos com o sangue vermelho e que podemos nos ajudar e ajudar ao próximo sempre por sermos, em essência, todos “um” só!

Agradeço a todos os colegas do laboratório, cada qual com sua importância na minha formação, aos sempre solícitos Professores Doutores dos outros laboratórios que viabilizaram minha pesquisa e sem as quais parcerias seria impossível chegar até aqui. Obrigado por perceber que o trabalho em grupo está acima de qualquer outra condição e que profissionalmente podemos ter um foco com o grande interesse na ciência. Reconheço, finalmente, o apoio financeiro que pôde fomentar o progresso deste trabalho que foi a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

# SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	i
<b>Lista de Figuras</b> .....	iii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	ix
<b>Resumo</b> .....	xii
<b>Abstract</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Descoberta do hormônio: Grelina .....	1
1.2. Estrutura Molecular .....	3
1.3. Receptores do hormônio do crescimento (GHSRs) .....	5
1.4. Mecanismo de ação .....	7
1.5. Hemodinâmica sistêmica e a participação da Grelina e seus receptores GHS-R1a no controle da função renal .....	9
1.6. Papel da Grelina e dos receptores GHS-R1a sobre o controle da função cardiovascular .....	11
1.7. Modelos experimentais para estudo da função renal .....	14
1.8. Hipertensão Arterial Sistêmica e função renal .....	16
1.9. Papel pleiotrópico da Grelina e dos receptores GHS-R1a .....	17

<b>2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b> .....	20
2.1. Justificativa .....	20
2.2. Objetivo geral .....	20
2.3. Objetivos específicos .....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Animais .....	22
3.2. Drogas e reagentes .....	22
3.3. Plestimografia de cauda .....	23
3.4. Desenho Experimental .....	24
3.4.1. Experimento 1 – Papel da Grelina e dos receptores GHS-R1a no controle da função renal de ratos normotensos (WT) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) .....	24
3.4.2. Experimento 2 – Investigação dos efeitos da administração aguda de Grelina sobre a resposta hemodinâmica renal e aórtica: Registro da Pressão Arterial Média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Condutância Vascular Renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA) .....	29
3.4.3. Experimento 3 – Expressão dos receptores GHS-R1a sobre a artéria renal e aórtica, no córtex e medula renal em animais hipertensos (Western Blot) ...	31
3.5. Análise Estatística .....	33
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34

4.1. Quantidade de ingestão de ração (g), produção de fezes (g), ingestão de água (ml) e volume urinário (ml) .....	34
4.2. Osmolaridade plasmática (mOsm), osmolaridade urinária (mOsm), clearance osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e clearance de água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) .....	40
4.3. Sódio [ $\text{Na}^+$ ] e Potássio [ $\text{K}^+$ ] plasmático e Urinário (mEq/L) .....	45
4.4. Creatinina plasmática (mg/dL), Creatinina urinária (mg/dL), Creatinina urinária (mg/24horas) e Clearance de creatinina/peso (ml/min/Kg) .....	49
4.5. Investigação dos efeitos da administração aguda de Grelina e do papel dos receptores GHS-R1a sobre a hemodinâmica renal .....	54
4.6. Investigação da expressão dos receptores de Grelina, GHS-R1a, na artéria aorta, artéria renal, medula renal e córtex renal .....	58
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>
<b>8. ANEXO I</b> .....	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- cAMP** – Adenosina monofosfato ciclíca
- Ang II** – Antiotensina II
- ARC** – Arcuate Nucleus **Ca<sup>2+</sup>** – Cálcio
- CEUA** – Comitê de Ética e Uso de Animais
- °C** – Graus Celsius
- Cr** – Creatinina
- CrP** – Creatinina Plasmática
- CrU** – Creatinina Urinária
- CICr** - Clearance de Creatinina
- FC** – Frequência Cardíaca
- GRE** – Grelina
- GH** – Hormônio do Crescimento
- GHS** – Secretagogos do Hormônio do Crescimento
- GHS-Rs** – Receptores Secretagogos do Hormônio do Crescimento
- GHS-R1a e 1b** – Receptores Secretagogo do Hormônio do Crescimento Tipo 1a e Tipo 1b.
- GOAT** – Grelina O-Acil transferase
- GHRH** – Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
- GHPR-6** – Peptídeo Liberador do GH6
- GPCR** – Receptores acoplados a proteína G.
- MK0677** – Agonista dos receptores GHS-R1a
- PF 04628935** – Antagonista dos receptores GHS-R1a
- WT** – Ratos normotensos Wistar
- SHR** – Ratos espontaneamente hipertensos
- VHE** – Veículo
- NaCl** – Cloreto de Sódio
- SGI** – Sistema Gastro-Intestinal
- AT** – Antagonista
- AGO** – Agonista
- FC** – Frequência Cardíaca
- SRAA** – Sistema renina angiotensina aldosterona

**CVR** – Condutância Vascular Renal  
**CVA** – Condutância Vascular Aortica  
**PA** – Pressão arterial  
**HAS** – Hipertensão arterial sistêmica  
**PAM** – Pressão Arterial Média  
**FSR** – Fluxo Sanguíneo Renal  
**FSA** – Fluxo Sanguíneo Aórtico

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Mecanismo de ação mostrando à possível sinalização da grelina nos receptores acoplados a proteína G (GPCR) e os secretagogos para o hormônio do crescimento (GHS-R). A ação acontece simultaneamente com a sinalização do hormônio liberador do hormônio do crescimento e seu receptor previamente conhecido (GHRH-R). A partir da descoberta dos segundos mensageiros chegou-se a molécula sinalizadora endógena procurada (grelina) por farmacologia reversa (Adaptado de SATO *et al.*, 2012). GH - Hormônio do crescimento; GHRH-R - Receptores dos Hormônios liberadores do GH; cAMP adenosina monofosfato cíclica; Ca<sup>2+</sup>- Cálcio; GPCR - Receptores acoplados a proteína G ..... 2

**Figura 2** – Processo codificação gênica da Desacilgrelina (A) e de acilação da grelina com mediação enzimática da Grelina O-aciltransferase (GOAT) (B), passo fundamental para a interação da grelina com os receptores GHS-R1a (Secretagogos para o hormônio do crescimento) adaptado de CASTAÑEDA *et al.*, 2010 e TAYLOR *et al.*, 2012 ..... 4

**Figura 3** - Estrutura primária dos receptores secretagogos do hormônio do crescimento (GHS-R1a) com os 7 domínios transmembrana (A), adaptado de Liu, Garcia e Karbonits, 2011). Ilustração desses receptores (GHS-R1a) acoplado à proteína G com sua estrutura heterotrimérica com as subunidades G $\alpha$ , G $\beta$  e G $\gamma$  (B). Conformação espacial do GHS-R1a (C), adaptado de HOELZ *et al.*, 2013 ..... 6

**Figura 4** – Mecanismo de ação da grelina simultaneamente com o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) sobre células adenohipofisárias (Adaptado de MOREIRA E SOARES, 2007). GH-Hormônio do crescimento; GHRH-R-Receptores dos Hormônios liberadores do GH; cAMP adenosina monofosfato cíclica; [Ca<sup>++</sup>] Cálcio; GPCR-Receptores acoplados a proteína G ..... 8

**Figura 5** - Mecanismos de controle da pressão arterial com destaque para a função renal encarregada de ajustes a longo prazo. Notar que a pressão arterial (resistência

periférica x débito cardíaco) conta com ajustes neuroendócrinos e cardiovasculares (coração e vasos), adaptado (CASARE, 2015) .....	10
<b>Figura 6</b> – Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e formação da angiotensina II (ANG II). São mostradas as etapas e estruturas envolvidas nos ajustes da pressão arterial passando pela função renal via aldosterona e vasopressina (Adaptado de Silverthorn, 2010) .....	13
<b>Figura 7</b> – Principais efeitos fisiológicos da grelina com o questionamento sobre a função renal e hemodinâmica, grande eixo temático dessa pesquisa (adaptação de Vriese e Delporte, 2008) .....	18
<b>Figura 8</b> – Possíveis repercussões da interação Grelina-GHS-R1a que norteiam as principais hipóteses deste trabalho. Função renal e cardiovascular além do sistema nervoso central (setas finas) e estômago (setas grossas). GHS-R1a (Receptores secretagogos para o hormônio do crescimento), PVN (núcleo paraventricular, hipotálamo), ARC (núcleo arqueado) e NTS (núcleo do trato solitário) .....	19
<b>Figura 9</b> – Esquema mostrando a sequência de procedimentos da plestimografia de cauda (SILVA, 2016) .....	23
<b>Figura 10</b> – Imagem do modelo de gaiola metabólica usada no estudo .....	25
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática da sequência experimental .....	26
<b>Figura 12</b> – Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos .....	29
<b>Figura 13</b> – Representação esquemática da sequência experimental: (A) procedimentos gerais; (B) primeira série experimental: injeção de Grelina (10ug/kg) em WT e SHR; (C) segunda série experimental: injeção de PF046289835 (0,4mg/kg) seguida de Grelina (10ug/kg) em SHR .....	30
<b>Figura 14</b> – Etapas básicas do <i>Western blot</i> para análise de expressão do GHS-R1a obtido de <a href="https://laneurotox.net.br/imunoquimica-em-07/09/2018">https://laneurotox.net.br/imunoquimica em 07/09/2018</a> .....	32

**Figura 15** – Comparação da ingestão de ração (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina– 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 35

**Figura 16** - Comparação da quantidade de fezes (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina– 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 36

**Figura 17** - Comparação da ingestão de água (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina– 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT ..... 37

**Figura 18** – Comparação do volume urinário (ml) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina– 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As

comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 38

**Figura 19** – Comparação da osmolaridade plasmática (mOsm) (A) e comparação da osmolaridade urinária (mOsm) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina– 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 41

**Figura 20** – Comparação do Clearance osmolar (µL/min) (A) e comparação do Clearance de água (µL/min) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina– 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 43

**Figura 21** – Comparação da concentração de sódio [Na<sup>+</sup>] e [K<sup>+</sup>] plasmático (mEq/L) (A-B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 45

**Figura 22** – Comparação da concentração de sódio [ $\text{Na}^+$ ] e [ $\text{K}^+$ ] urinário (mEq/L) (A-B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina-10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (GRE); Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AGO). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 47

**Figura 23** – Comparação da concentração de Creatinina plasmática (mg/dL) (A) e comparação da concentração de Creatinina urinária(mg/dL) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (GRE); Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AGO). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 50

**Figura 24** – Comparação da concentração de Creatinina urinária (mg/24horas) (A) e comparação do clearance de Creatinina/peso (ml/min/Kg) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (GRE); Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AGO). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. As comparações foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); #vs. WT mesmo tratamento ..... 52

**Figura 25** – Primeira série experimental para investigação dos eventos hemodinâmicos: Comparação dos efeitos da administração intravenosa *in bolus* de Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) em animais normotensos (WT, n=6) e hipertensos (SHR, n=6). Foram avaliadas as variações da Pressão Arterial Média (PAM, % linha de base, A);

Frequência Cardíaca (FC, % linha de base, B); Condutância Vascular Renal (CVR, % linha de base, C) e Condutância Vascular Aórtica (CVA, % linha de base, D). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. \*Diferente do tempo 0;  $p < 0,05$ . A linha tracejada representa o momento da injeção de grelina para cada grupo ..... 55

**Figura 26** – Segunda série experimental para investigação dos eventos hemodinâmicos: Comparação dos efeitos da administração intravenosa, *in bolus*, de Grelina (10 $\mu$ g/Kg) e a administração do Antagonista GHS-R1a em animais hipertensos (SHR, n=6). Foram avaliadas as variações da Pressão Arterial Média (PAM, % linha de base, A); Frequência Cardíaca (FC, % linha de base, B); Condutância Vascular Renal (CVR, % linha de base, C) e Condutância Vascular Aórtica (CVA, % linha de base, D). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. \*Diferente do tempo 0; † Diferente do controle;  $p < 0,05$ . A linha tracejada representa o momento da injeção de Grelina e do Antagonista GHS-R1a (PF04628935) ..... 56

**Figura 27** - Comparação da expressão dos receptores GHS-R1a na artéria aorta (A), artéria renal (B), medula (C) e córtex (D) renal de animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR). Os dados foram expressos como Média  $\pm$  EPM e analisados por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$  vs. WT) ..... 58

**Figura 28-** Principais achados experimentais a partir da investigação dos efeitos do eixo Grelina-GHS-R1a confirmando as hipóteses iniciais que sugeriam o controle diferencial do eixo em relação à função renal e ajustes hemodinâmicos em animais hipertensos ..... 68

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos ..... 24

**Tabela 2.** Síntese dos resultados das comparações da ingestão de ração (g), quantidade de fezes (g), ingestão de água (ml) e volume urinário (ml) dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (vs. veículo) e SHR x VEH (vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (#vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg / Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. Análise através de Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo; #vs. mesmo tratamento. \* ↑ = Aumento significativo; \* ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05..... 39

**Tabela 3.** Síntese dos resultados das comparações da osmolaridade plasmática (mOsm), osmolaridade urinária (mOsm), clearance osmolar (µL/min) e clearance da água (µL/min) dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (vs. veículo) e SHR x VEH (vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (# vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Análise através de Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo; # vs. mesmo tratamento. \* ↑ = Aumento significativo; \* ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05..... 44

**Tabela 4.** Síntese dos resultados das comparações das concentrações de sódio e potássio plasmático e urinário (mEq/L) dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (\* vs. veículo) e SHR x VEH (\* vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (# vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. Análise através de Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo; #vs. mesmo tratamento. \* ↑ = Aumento significativo; \* ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05..... 48

**Tabela 5.** Síntese dos resultados das comparações das concentrações da creatinina plasmática e urinária (mg/dl), creatinina (mg/24horas) e clearance de creatinina/ peso dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (\* vs. veículo) e SHR x VEH (\* vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (#vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. Análise através de Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo; #vs. mesmo tratamento. \* ↑ = Aumento significativo; \* ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05..... 53

**Tabela 6.** Síntese dos resultados apresentados em relação à resposta hemodinâmica dos animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) após a injeção *in bolus* de Grelina a 10µg / Kg (WISTAR \*vs SHR) (A). Para avaliação da modulação dos receptores GHS-R1a, também estão apresentados os resultados, em outra série experimental, com injeção de Grelina a 10µg/Kg 20 e do antagonista 0,4mg/Kg (AT/PF04628935) (B). Os parâmetros vasculares investigados foram PAM (pressão arterial média), FC (frequência cardíaca), CVR (condutância vascular renal) e CVA

(condutância vascular aórtica). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. .  
 \* $\uparrow$  = Aumento significativo; \* $\downarrow$  = Diminuição significativa; - sem alteração significativa;  
 p < 0,05..... 57

**Tabela 7.** Síntese da comparação dos resultados apresentados para avaliara expressão dos receptores GHS-R1a para animais normotensos (WT) e animais hipertensos (SHR) por *Western Blot*. Os resultados revelam que não houve diferenças significativas entre animais normotensos (WT) e animais espontaneamente hipertensos (SHR) na maioria das estruturas observadas. A expressão dos receptores GHS-R1a em SHR, porém, apresentou diminuição estatisticamente significante em relação ao córtex renal comparados aos animais normotensos (WT). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para p < 0,05. + houve a expressão dos receptores GHS-R1a; para o córtex renal \* $\downarrow$  significa a mesma expressão diminuída..... 59

## RESUMO

A grelina (GRE) é um peptídeo de 28 aminoácidos que depende da acilação da serina na posição 3 para agir como molécula sinalizadora nos receptores secretagogos do hormônio do crescimento (GHS-Rs). Sua função depende dessa interação e estes receptores se expressam em diversos tecidos o que pode implicar em ações multissistêmicas. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar, dentre essas ações, as respostas relativas à função renal e hemodinâmica em ratos normotensos e hipertensos através administração da grelina e dos agonistas (MK0677) e antagonistas (PF04628935) do GHS-R1a. Com esse intuito foram utilizados ratos como modelos experimentais sendo normotensos (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR). Foram estabelecidos os seguintes desenhos experimentais: 1- Ratos foram submetidos a injeções subcutânea (s.c) de veículo (VEH) (NaCl 0,9%), grelina (GRE) (10µg / Kg), antagonista de GHS-R1a AT (PF04628935) (0,4mg / Kg), grelina + PF0462893 ou agonista de GHS-R1a AGO (MK0677) (10µg / Kg) e mantidos em gaiolas metabólicas para posterior análise urinária e plasmática. 2- Animais WT e SHR receberam injeções intravenosas (i.v.) de grelina (10 / kg), PF04628935 (0,4 mg / kg) ou uma combinação de grelina e PF04628935 para registro da condutância vascular. 3- Avaliou-se a expressão dos receptores GHS-R1a por *Western blot* na artéria aorta, artéria renal, no córtex e medula renal. Os parâmetros metabólicos (função renal) revelaram diferenças significativas em relação à ingestão de água e ração bem como os volumes urinários tanto no mesmo grupo tratado Wistar e SHR. O mesmo foi observado para os clearance da água livre e de creatinina além da osmolaridade e níveis urinários de sódio e potássio. A injeção intravenosa de grelina reduziu a pressão arterial média em ambas às linhagens sem evocar alterações cronotrópicas significativas. A grelina aumentou a Condutância Vascular Renal (CVR) em ratos SHR. Os efeitos hipotensivos e vasomotores (CVR) produzidos pela grelina em ratos SHR foram revertidos pelo antagonismo específico de GHS-R1a com PF04628935 (20 minutos após a injeção de grelina), para todas as análises foi determinado  $p < 0,05$ . A expressão dos receptores GHS-R1a se mostrou diminuída no córtex renal dos animais SHR. Dessa forma, os dados obtidos sugerem possíveis participações da grelina e dos receptores GHS-R1a nos ajustes da função renal e hemodinâmica de ratos normotensos e hipertensos.

**Palavras-Chave:** Grelina; receptores GHS-R1a; interação grelina-GHS-R1a; função renal; hemodinâmica.

## ABSTRACT

Ghrelin (GRE) is a 28-amino acid peptide that depends on the acylation of serine at position 3 to act as a signaling molecule on growth hormone secretagogues (GHS-Rs). Its function depends on this interaction and these receptors are expressed in several tissues which may imply multisystemic actions. The objective of this research was to evaluate the responses related to renal and hemodynamic function in normotensive and hypertensive rats through administration of ghrelin and GHS-R1a agonists (MK0677) and antagonists (PF04628935). For this purpose, mice were used as experimental models being normotensive (WT) and spontaneously hypertensive (SHR). The following experimental designs were established: 1) Rats were injected subcutaneously (sc) vehicle (VEH) (NaCl 0,9%), ghrelin (GRE) (10 $\mu$ g / kg), GHS-R1a AT antagonist (PF04628935) (0.4mg / kg), ghrelin + PF0462893 or GHS-R1a agonist AGO (MK0677) (10 $\mu$ g / kg) and maintained in metabolic cages for further urinary and plasma analysis. 2- WT and SHR animals received intravenous (i.v.) injections of ghrelin (10 / kg), PF04628935 (0.4 mg / kg) or a combination of ghrelin and PF04628935 for vascular conductance record. 3 - GHS-R1a receptor expression was evaluated by Western blot in the aortic artery, renal artery, cortex and renal medulla. Metabolic parameters (renal function) revealed significant differences in relation to water and feed intake as well as urinary volumes in both the Wistar and SHR treated groups. The same was observed for free water and creatinine clearance in addition to osmolarity and urinary sodium and potassium levels. Intravenous injection of ghrelin reduced mean blood pressure in both strains without evoking significant chronotropic changes. Ghrelin increased Renal Vascular Conductivity (CVR) in SHR rats. The hypotensive and vasomotor effects (CVR) produced by ghrelin in SHR mice were reversed by the specific antagonism of GHS-R1a with PF04628935 (20 minutes after ghrelin injection), for all analyzes was determined ( $p < 0.05$ ). GHS-R1a receptor expression was shown to be decreased in the renal cortex of SHR animals. Thus, the data obtained suggest possible participation of ghrelin and GHS-R1a receptors in renal function and hemodynamic adjustments of normotensive and hypertensive rats.

**Keywords:** Ghrelin; ghrelin-GHS-R1a receptors; Ghrelin-GHS-R1a interaction; hemodynamic.

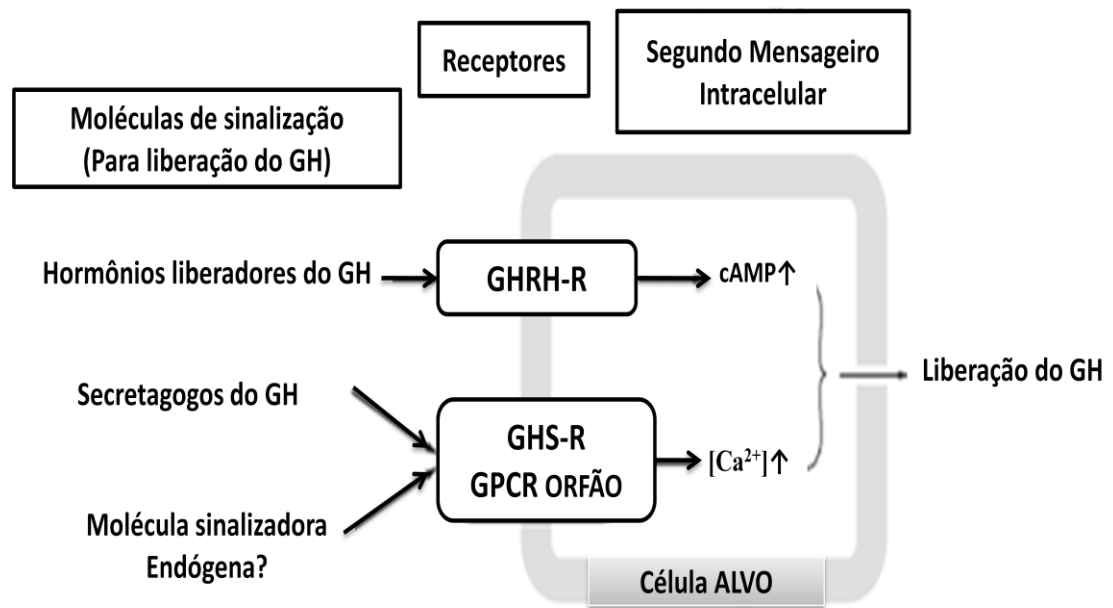
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Descoberta do hormônio: Grelina

A análise do histórico da descoberta da Grelina (GRE) revela que os primeiros estudos estavam voltados para a investigação dos fatores relacionados à liberação do hormônio de crescimento (GH). Neste contexto, descobriu-se que alguns peptídeos derivados de opióides apresentavam pequena atividade na liberação de GH e, a partir daí, alguns desses peptídeos passaram a ser sintetizados e testados em modelos animais (1-6).

Em conjunto, essas moléculas que estimulavam a liberação do GH foram denominadas de secretagogos do hormônio de crescimento (GHS), dentre os quais estavam o peptídeo liberador do GH 6 (GHPR-6) e a hexarelina (1, 3). A descoberta do hormônio liberador do GH (GHRH) e seu antagonista, a somatostatina, mudou o foco das pesquisas que, a partir de então, buscaram entender os mecanismos de ação do GHRH na regulação da atividade de células somatotróficas (5, 9).

Entretanto, alguns grupos de cientistas descobriram que o GHRH não agia sozinho e esse fato ganhou solidez com a descoberta e clonagem dos receptores dos hormônios secretagogos do hormônio do crescimento (GHS-R) (1, 10). Na medida em que a rota metabólica do GHRH foi sendo decifrada, a partir da sua interação com um receptor próprio, o receptor para GHRH (GHRH-R), surgiu a dúvida de qual molécula, o potencial ligante endógeno, atuaria nos GHS-R que, em sinergismo com o GHRH, determinariam a produção e secreção do hormônio do crescimento (1, 11) (Figura 1).



**Figura 1** – Mecanismo de ação mostrando à possível sinalização da grelina nos receptores acoplados a proteína G (GPCR) e os secretagogos para o hormônio do crescimento (GHS-R). A ação acontece simultaneamente com a sinalização do hormônio liberador do hormônio do crescimento e seu receptor previamente conhecido (GHRH-R). A partir da descoberta dos segundos mensageiros chegou-se a molécula sinalizadora endógena procurada (grelina) por farmacologia reversa (Adaptado de SATO *et al.*, 2012) (3). GH-Hormônio do crescimento; GHRH-R-Receptores dos Hormônios liberadores do GH; cAMP adenosina monofosfato cíclica;  $Ca^{2+}$ - Cálcio; GPCR-Receptores acoplados a proteína G.

Neste cenário, foi usada a estratégia do receptor órfão, geralmente um receptor acoplado a proteína G (GPCR), cujos ligantes e vias de sinalização puderam ser descobertos pela análise do recrutamento de segundos mensageiros. Esse método já havia sido usado para estudar a atividade de vários outros peptídeos bioativos e medicamentos, através de vias indiretas de expressão gênica em células transfectadas com receptores que foram incubadas com diferentes moléculas potenciais, a conhecida farmacologia reversa (10, 12). Na busca de um potencial sinalizador endógeno para os GHS-R e, portanto, no intuito de identificar a estrutura complementar ao GHRH nas alças de *feed back* que controlam a produção do GH, Kojima (1999) e seus colaboradores testaram vários tecidos (13).

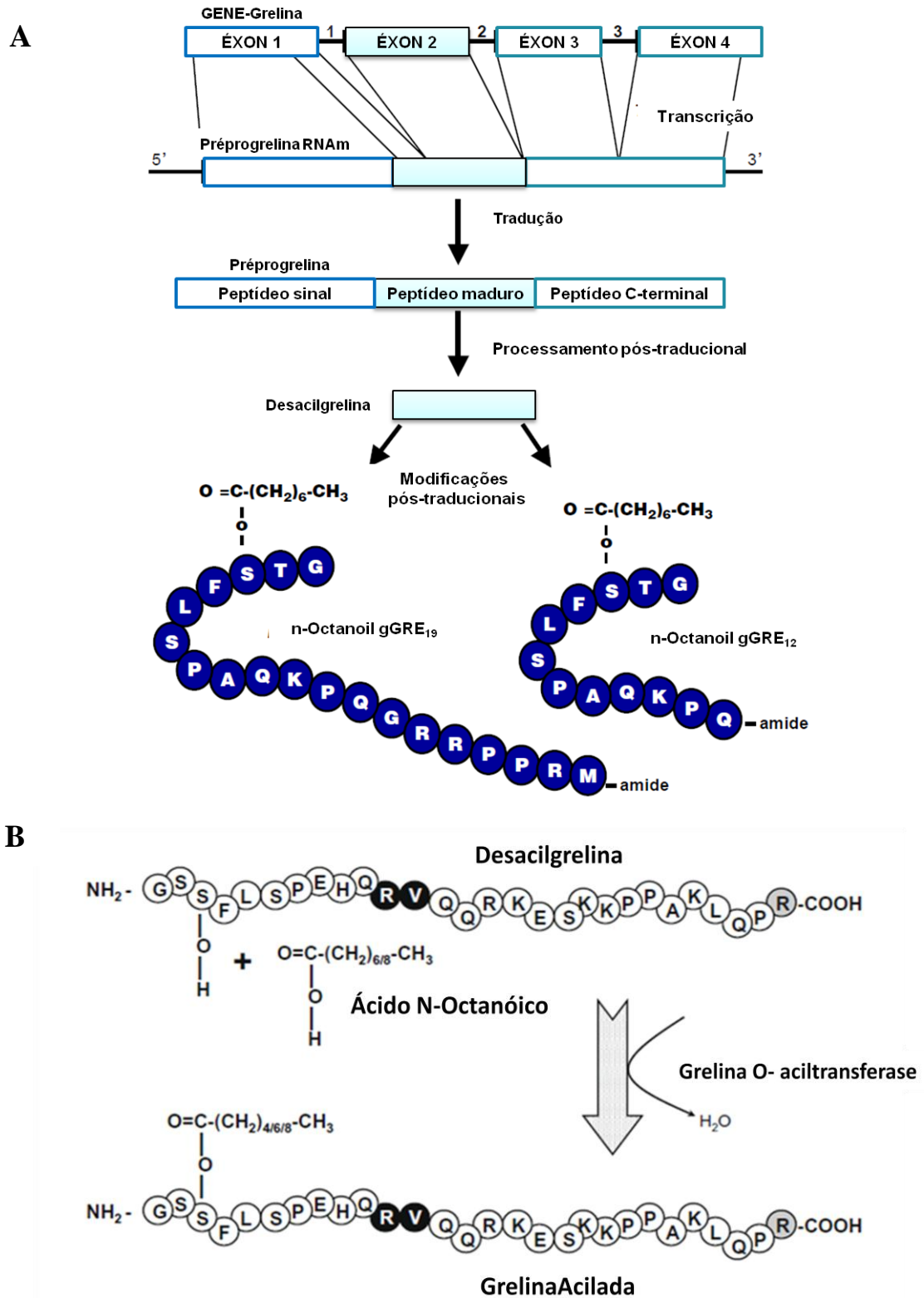
Para o grupo, surpreendentemente, dos vários órgãos e tecidos investigados como cérebro, pulmão, coração, rins e intestinos foi no subconjunto de células endócrinas na mucosa estomacal (glândulas oxínticas) que se encontrou a maior expressão da molécula procurada que denominaram de **Grelina**

(GRE), onde *Ghre* é prefixo da língua proto-indo-européia com significado de “Crescer”, uma alusão à relação do novo agente descoberto como coadjuvante na liberação do hormônio do crescimento (5, 13).

No seu artigo “The Discovery of ghrelin – A personal memory” escrito em 2008, o pioneiro Masayasu Kojima descreve a felicidade dessa descoberta já com quase uma década passada. Nesse trabalho, Kojima tece um relato pessoal, onde comenta como a pesquisa e o pesquisador necessitam de esforço e sorte. Mas, ainda com esse reconhecimento, Kojima talvez não imaginasse o arsenal de possibilidades que surgiram a partir do esclarecimento da existência da grelina e a elucidação de sua estrutura e função (10, 14-16).

## **1.2. Estrutura molecular**

A estrutura molecular da GRE revela sua natureza peptídica, constituída por 28 aminoácidos. A molécula, que guarda grande similaridade estrutural entre os vertebrados de diferentes espécies, é codificada por setores específicos do seu gene composto por 4 éxons e 3 íntros. O RNAm pré-progrelina resulta da transcrição desse gene que forma os peptídeos precursores dispostos em três regiões: peptídeo sinal, peptídeo maduro e peptídeo C-terminal. A desacilgrelina é formada por mudanças pós-traducionais do peptídeo maduro como mostra a figura 2A (7-8).



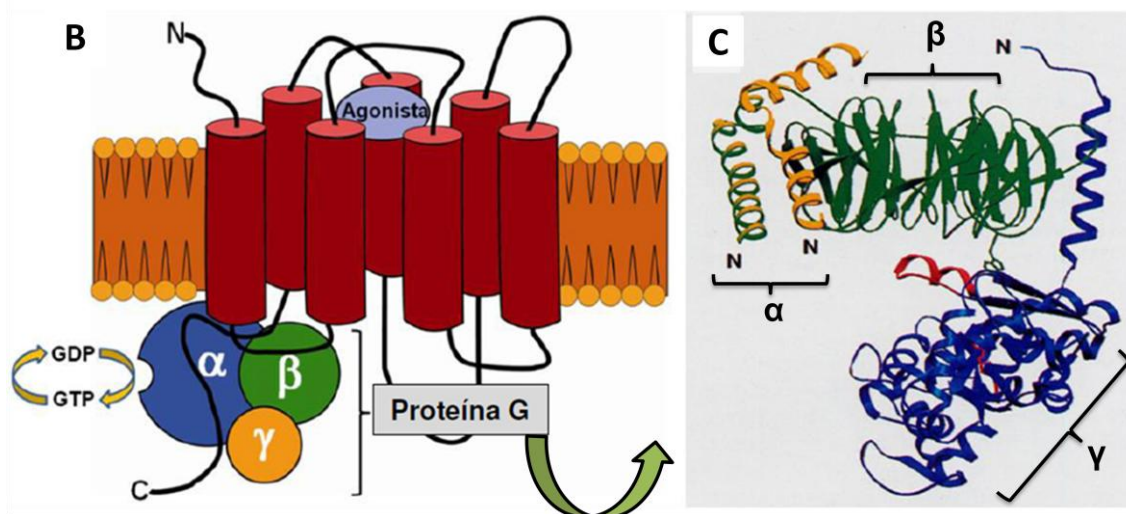
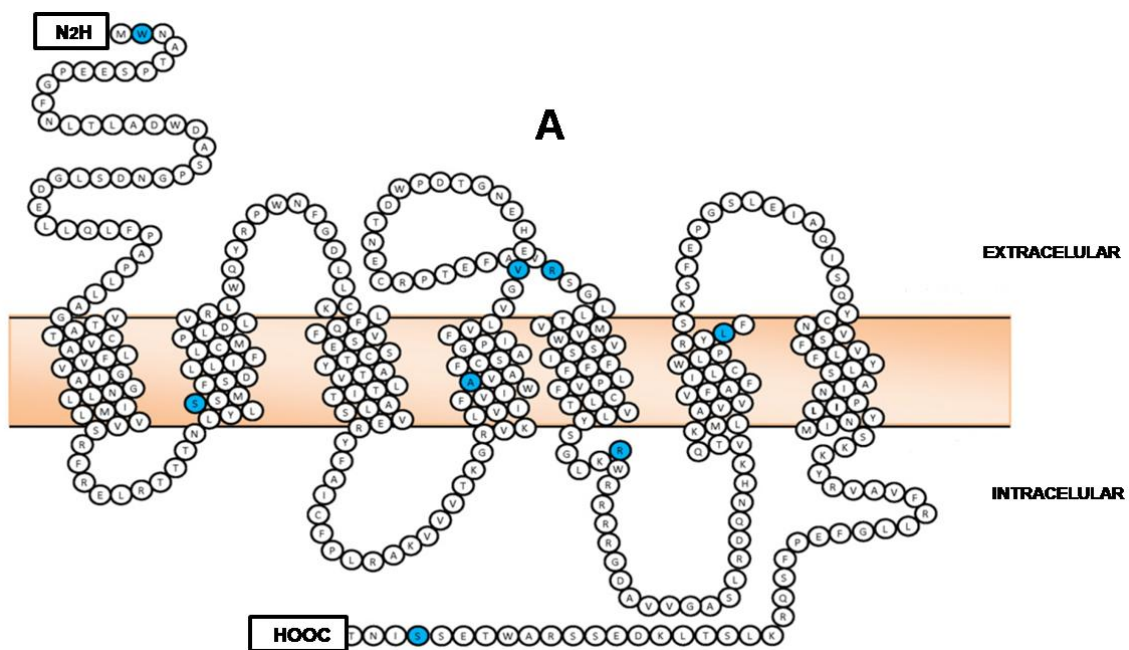
**Figura 2** – Processo codificação gênica da Desacilgrelina (A) e de acilação da Grelina com mediação enzimática da Grelina O-aciltransferase (GOAT) (B), passo fundamental para a interação da Grelina com os receptores GHS-R1a (Secretagogos para o hormônio do crescimento) adaptado de CASTAÑEDA *et al.*, 2010 e TAYLOR *et al.*, 2012 (7-8).

A diferença da GRE entre humanos e ratos está nos resíduos de aminoácidos na posição 11 e 12, onde se observa a presença de arginina e valina nos homens e lisina e alanina nos ratos, respectivamente (14). Um aspecto determinante de sua ação biológica é o processo de octanoilação (Acilação) mediado por enzimas específicas denominadas Grelina O-aciltransferases (GOAT) que catalisam a substituição do grupo hidroxil do terceiro aminoácido n-terminal, a serina, por uma molécula hidrofóbica  $C_7H_{15}CO$  (octanoil) (Figura 2B). Esta modificação pós-traducional confere maior lipofilicidade à molécula, sendo imprescindível para a interação efetiva com os receptores GHS-R expressos em diferentes tecidos, que estão divididos em subtipos GHS-R1a e GHS-R1b produzidos por *splicing* alternativo de um gene inicial. Tal processo envolve clivagens reguladas durante a expressão gênica em éxons de um transcrito primário da molécula de RNAm que pode determinar a codificação de peptídeos diferentes a partir de um mesmo gene (17-19).

Ainda que a forma octnoilada (acilada) da GRE seja mais conhecida, a forma desactonoilada (desacilada) circula em maior percentual no plasma sanguíneo (10). Esta, virtualmente incapaz de se ligar ao GHS-R1a, pode participar da indução de adiposidade em ratos, o que abre novas possibilidades de investigação de efeitos para ambos os subtipos de receptores. Outros trabalhos revelam que mesmo originadas por um precursor comum, a grelina acilada e a desacilgrelina apresentam efeitos antagônicos, uma vez que a última diminui a ingestão de alimentos e retarda o esvaziamento gástrico, agindo principalmente no núcleo paraventricular e núcleo arqueado do hipotálamo (20-24).

### **1.3. Receptores do hormônio do crescimento (GHS-Rs)**

Os receptores secretagogos do hormônio do crescimento (GHS-Rs) foram clonados em 1996 por Howard e colaboradores, a partir da hipófise e hipotálamo de humanos e suínos (25). O subtipo GHS-R1a, em humanos, é uma proteína de 366 aminoácidos com 7 domínios transmembranares conforme demonstrado na figura 3 (26). Esses receptores são acoplados a proteína G (GPCR) e, portanto, atuam promovendo a transdução de sinal através da ligação em domínios extracelulares específicos que desencadeiam a ativação de proteínas heterotriméricas com subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  e  $G\gamma$ , como mostram a figura 3B e 3C (27).



**Figura 3** – Estrutura primária dos receptores secretagogos do hormônio do crescimento (GHS-R1a) com os 7 domínios transmembrana (A), adaptado de Liu, Garcia e Karbonits, 2011 (26). Ilustração desses receptores (GHS-R1a) acoplado à proteína G com sua estrutura heterotrimérica com as subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  e  $G\gamma$  (B). Conformação espacial do GHS-R1a (C), adaptado de HOELZ *et al.*, 2013 (27).

Várias moléculas sinalizadoras, desde neurotransmissores a hormônios como a grelina, bem como seus agonistas ou antagonistas, podem interagir com esses receptores e iniciarem várias cascatas metabólicas para diferentes respostas fisiológicas. Desta forma, a partir dessa dimensão funcional, esses receptores são investigados e a compreensão de seus mecanismos é fundamental para descobertas fisiopatológicas e para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e diagnósticos (27).

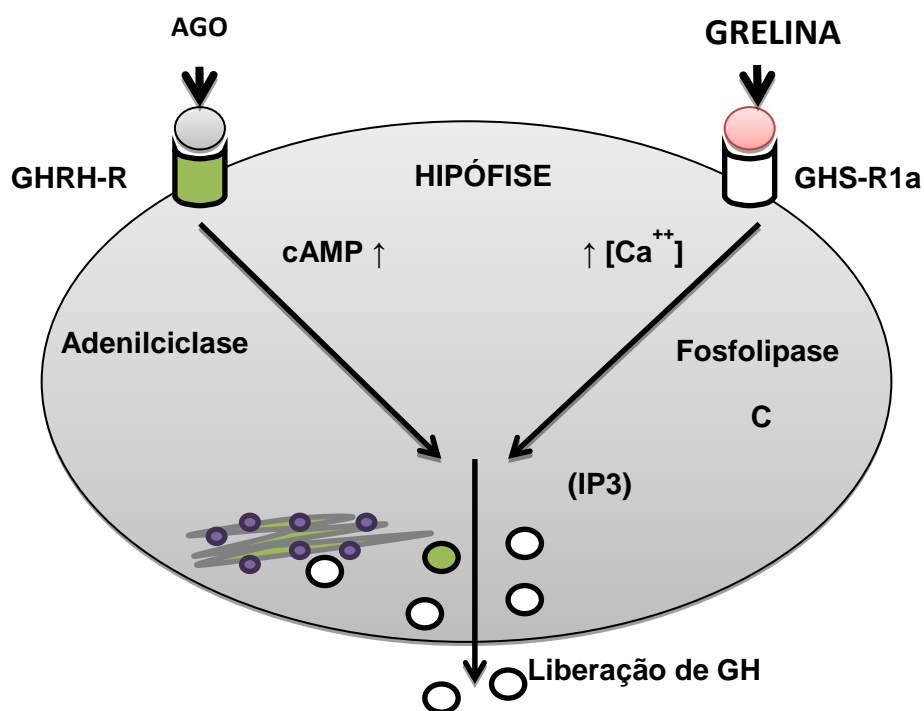
Por serem expressos em vários tecidos como células hipotalâmicas e somatotróficas da adenohipófise, tecido cerebral, pâncreas, estômago, gônadas, coração e aorta, além dos rins, os receptores GHS-R1a podem desempenhar um papel multissistêmico (28-29). A grelina, por sua vez, é produzida predominantemente por um subconjunto de células endócrinas da mucosa estomacal (glândulas oxínticas), podendo também ser produzida por outros órgãos como coração, pulmão, pâncreas, gônadas, tecido linfático, tireóide, glândulas adrenal, placenta, hipófise, hipotálamo e rins, entre outros (30-33). Este fato contribui para a ampla possibilidade de respostas fisiológicas que podem resultar da interação da grelina com os receptores GHS-R1a (34-35). A partir dessas características investigadas, a interação entre grelina-GHS-R1a alcançou um patamar importante para fisiologia geral na atualidade, assim como para compreensão de fisiopatologia cardiovascular, metabólica e renal (3, 10, 36-38).

Quanto ao caráter fisiopatológico, algumas pesquisas permitem sugerir que a manipulação farmacológica da grelina e dos receptores GHS-R1a poderia ser uma alternativa em potencial para o tratamento de doenças cuja fisiopatologia envolve fatores metabólicos como obesidade e diabetes, caquexia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), infarto, doença renal crônica, inflamações e outros distúrbios homeostáticos (37, 39). O conhecimento da ação e interação dessas moléculas pode ser promissor para a evolução da abordagem diagnóstica, como futuros biomarcadores da função renal e cardiovascular (40-43).

#### **1.4. Mecanismos de ação**

Uma vez estabelecidos os principais elementos ligados à liberação do GH, *a priori*, função elementar atribuída a GRE, os estudos passaram a investigar o seu mecanismo de ação (1, 11). Neste sentido, foi proposta a interação sinérgica entre

a GRE e o GHRH que, em sítios diferentes da célula hipofisária, passam a ativar os seus respectivos receptores GHS-R1a e GHRH. No caso da interação GRE + GHS-R1a, a ativação da via fosfolipase C – inositol-trifosfato (IP3) resulta no aumento de cálcio  $[Ca^{++}]$  intracelular. Este evento, associado à ação do GHRH em seu receptor (GHRH-R) via adenilciclase, aumenta os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), resultando na liberação do GH (Figura 4) (8, 28-29).



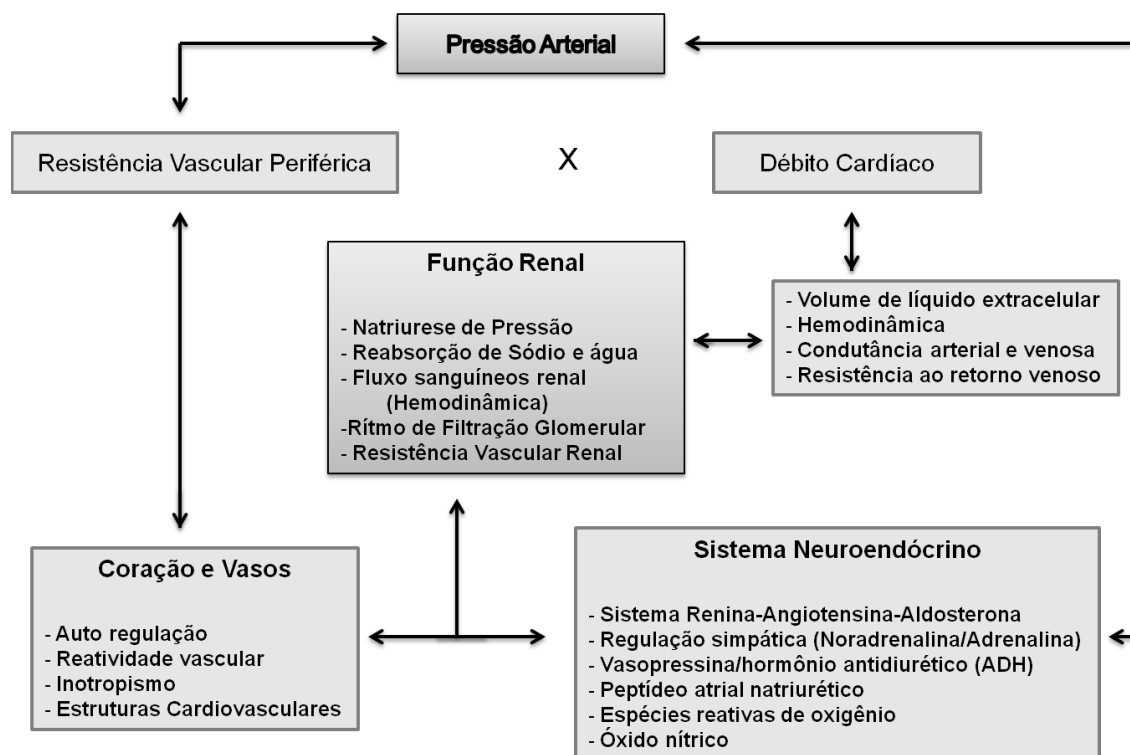
**Figura 4** – Mecanismo de ação da Grelina simultaneamente com o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) sobre células adenohipofisárias. GH-Hormônio do crescimento; GHRH-R-Receptores dos Hormônios liberadores do GH; cAMP adenosina monofosfato cíclica;  $[Ca^{++}]$  Cálcio; GPCR-Receptores acoplados a proteína G, Inositol trifosfato (IP3) (Adaptado de MOREIRA e SOARES, 2007) (29).

A grelina age de maneira endócrina, parácrina e autócrina, o que aumenta a possibilidade de interferir em outros eventos fisiológicos além da liberação do GH, como a estimulação na produção de prolactina, secreção de adrenocorticóides e modulação da liberação de insulina (44-45). Os estudos dessa molécula, com poder orexígeno (8, 46), integrante do eixo hipotálamo-hipófise-gastrointestinal, veio mostrar que o sistema gastrointestinal (SGI) não é um elemento passivo na regulação do metabolismo e no controle da homeostase (28-29, 32-33, 47).

### **1.5. Hemodinâmica sistêmica e a participação da Grelina e seus receptores GHS-R1a no controle da função renal**

A manutenção da homeostase dos fluidos corporais, controle do pH, produção de hormônios e excreção de resíduos metabólicos são funções atribuídas aos rins (48-49). Contribuir para a regulação da pressão arterial (PA) também é uma importante função renal, intimamente relacionada ao controle de mecanismos cardiovasculares e neuroendócrinos. Estes mecanismos interagem promovendo ajustes na resistência periférica e no débito cardíaco, cujo produto define a pressão arterial, figura 5 (50-51).

Em respostas a flutuações hemodinâmicas rápidas (regulação a curto prazo), sob regulação autonômica, barorreceptores e quimiorreceptores arteriais são capazes de ajustar a pressão arterial (PA) dispondo de estratégias vasoativas eficazes (36). Pesquisas pioneiras nessa área relacionaram o aumento da resistência periférica a um mecanismo de adaptação em médio prazo em uma dieta induzida por sobrecarga de sódio (52). Quanto aos mecanismos de regulação em longo prazo, o controle do balanço de sódio (ingestão/eliminação) se apresenta de forma decisiva na manutenção do controle do volume de líquido extracelular. Nesse contexto, a função renal exerce protagonismo (49, 53). A figura 5 relaciona a pressão arterial e os principais mecanismos de controle com destaque para a função renal.



**Figura 5** – Mecanismos de controle da pressão arterial com destaque para a função renal encarregada de ajustes a longo prazo. Notar que a pressão arterial (resistência periférica  $\times$  débito cardíaco) conta com ajustes neuroendócrinos e cardiovasculares (coração e vasos), Adaptado de CASARE, 2015 (54).

O controle dos níveis de água e eletrólitos está diretamente ligado ao fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e resistência vascular renal (55-56). A elevação da PA, desse modo, pode provocar um incremento na excreção de sódio e água (natriurese de pressão) que reduz o débito cardíaco (controle por volume) e retorna a pressão para níveis equilibrados (57).

Além dos fatores humorais e locais citados na representação da figura 5, outros hormônios podem contribuir para o controle da função renal e da pressão arterial. A grelina e seus receptores podem compor as vias de regulação dos níveis de eletrólitos e, de alguma forma, contribuir para o controle os níveis de líquido extracelular e a pressão arterial (38) já que também é produzida pelos rins e os receptores GHS-R1a expressos em estruturas renais como túbulos contorcidos distais e partes finas da alça de Henle (38, 58-59).

Estudos mostram o papel da grelina na vasodilatação da artéria renal que pode estar ligado à inibição dos gânglios simpáticos (60). O controle autonômico, especialmente através de seu braço simpático, é de suma importância para a regulação da função renal (61-62). As influências da atividade simpática sobre a

função renal são descritas por Matsumura (2002) e, da mesma maneira, mecanismos vasodilatadores (63-65) e de diurese na relação com hipertensão e função renal, tem sido relatado por diversas pesquisas (57, 60, 66).

Dimitrova e colaboradores mostraram que a grelina pode interagir com a endotelina 1 e exibir um efeito contrátil na arteríola renal (67). O efeito sobre a microvasculatura seria a principal contribuição da ação grelina-GHS-R1a para a fisiopatologia da hipertensão (38), o que poderia modificar a retenção ou a excreção de íons e fluidos. De fato, os baixos níveis de GHS-R1a encontrados nos rins de animais hipertensos (SHR) corroboram essa hipótese (68). Esses dados levantam a necessidade de investigações adicionais para descobrir se os mecanismos determinantes dos efeitos da grelina sobre a função renal são diretos ou resultantes da ação desse hormônio em outros sistemas (21).

Como a grelina pode ser capaz de participar do equilíbrio nos níveis de sódio, não parece ser impossível que tal hormônio também regule o apetite por esse ion, o que poderia afetar a função renal (57, 60). Em 2013, Aoki e co-autores mostraram que a administração de grelina aumenta a diurese e natriurese durante a hipertensão induzida pela sobrecarga de sódio (57). Esses achados divergem daqueles obtidos por Kemp e colaboradores (2013), que encontraram aumentos significativos na reabsorção de sódio no nível do túbulo distal e, portanto, diminuição na excreção de sódio (69). Sendo assim, várias questões ainda precisam ser esclarecidas sobre o papel da grelina na função renal (70). O estudo detalhado dessas questões pode resultar em novas estratégias terapêuticas para comorbidades cardiovasculares, renais e metabólicas como já destacado.

#### **1.6. Papel da Grelina e dos receptores GHS-R1a sobre o controle da função cardiovascular**

Considerando que a função renal é um determinante da homeostase cardiovascular, é possível que a interação grelina-GHS-R1a também possa atuar no controle da vasomotricidade de diferentes leitos nas condições de normotensão e hipertensão. Os efeitos vasculares são provavelmente investigados com o objetivo principal de delimitar se essas respostas resultam de efeitos centrais e/ou periféricos (71). Matsumura *et al.*, em 2002, revelaram que a injeção intravenosa de grelina reduz a pressão arterial de coelhos não anestesiados (63). A injeção intracerebroventricular de grelina produziu mudanças na pressão arterial que foram

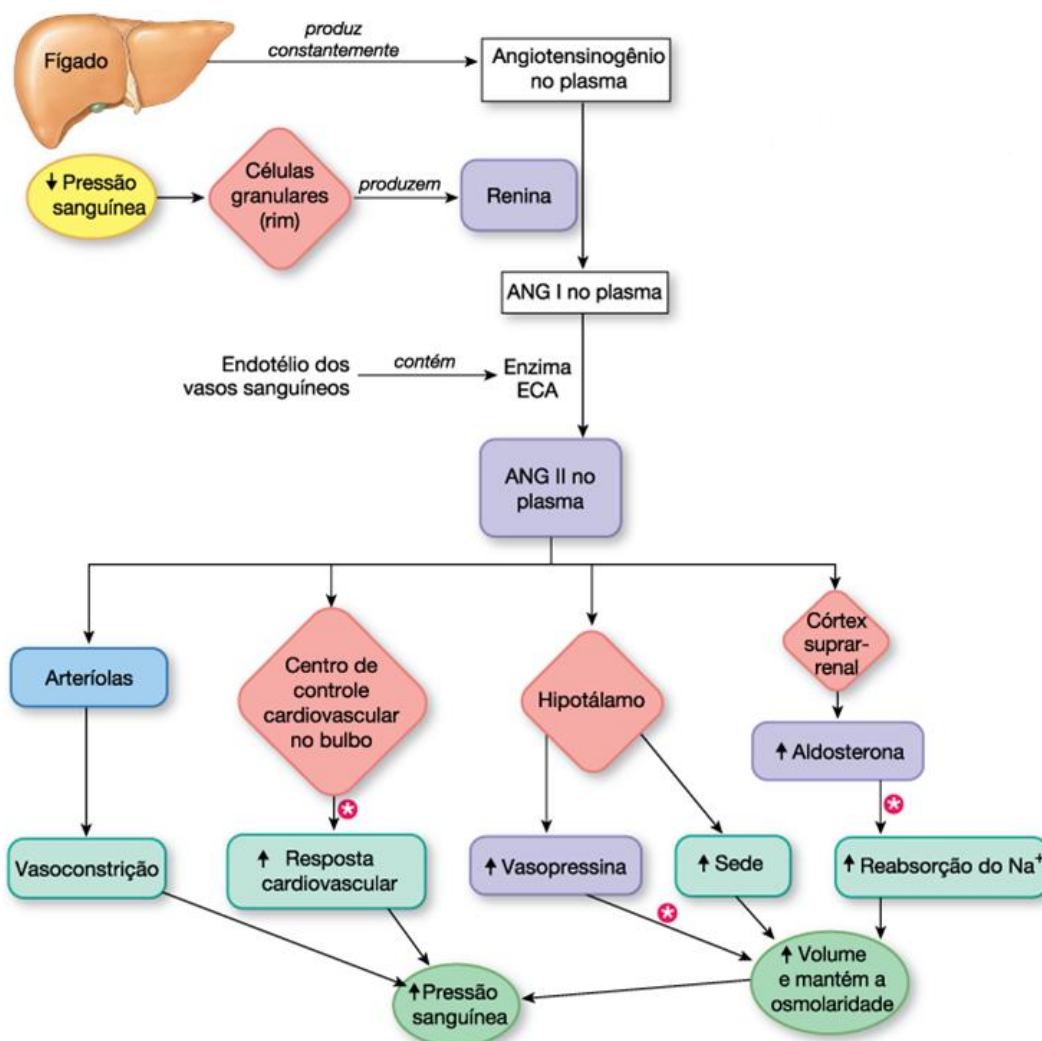
concomitantes a uma resposta cronotrópica cardíaca positiva (72). Também foi mostrado que a grelina e seus receptores produzem alguns efeitos sobre o controle barorreflexo (73), que é o principal mecanismo de curto prazo que regula as saídas autonômicas para a vasculatura (74-75).

Matsumura e colaboradores relataram a influência da atividade simpática sobre a função renal (63). Outras análises mostram a atuação dos mecanismos vasodilatadores provocados pela grelina (64-65), além do efeito na diurese que poderia estar relacionado à hipertensão e função renal (57, 60, 66). Nessa mesma linha, pesquisas revelam o papel da grelina nas respostas hemodinâmicas em situações isquêmicas (76), sua relação com o tônus vascular através de angiogramas e mielografia com fio (65), além do efeito da grelina em vários parâmetros cardiovasculares e sobre o controle da pressão arterial (56, 77-78). Desta forma, são várias as abordagens que avaliaram a influência da grelina nos mecanismos barorreflexos (74-75, 79), e as respostas provocadas por agonistas e antagonistas dos receptores GHS-R1a.

Em relação à regulação a longo prazo, pesquisas revelam diminuições da condutância vascular renal e hipertensão relacionada ao espessamento da cápsula renal (80-81). Enquanto uma ação contrátil da grelina foi observada nas artérias renais isoladas (67, 82), outros estudos mostraram que a grelina provocou a vasodilatação nas artérias coronárias isquêmicas de ratos (65). Embora algumas pesquisas mostrem os efeitos antagônicos da grelina sobre o endotélio (83), as respostas nem sempre estão confinadas a um mesmo leito vascular. A vasodilatação parece basear-se em caminhos oxidonitrérgicos, como revelado por aumentos na expressão de enzima que sintetiza o gás vasodilatador óxido nítrico (NO), a óxido nítrico sintetase (NOS), na aorta de camundongos deficientes em GH (84).

A correlação do eixo grelina-GHS-R1a com alguns agentes autacóides já foi investigada para o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (85), vasopressina (86), peptídeos natriuréticos atriais além de endotelina e óxido nítrico (57). Os efeitos vasodilatadores e vasoconstritores são controversos (67). Callaghan e colaboradores sugeriram que os agonistas do GHS-R1a podem ativar este receptor diferentemente da grelina (87). Novamente, as respostas pleiotrópicas e a localização dos receptores de grelina nos leitos vasculares devem ser consideradas e mais investigadas (88-89).

Neste contexto, o SRAA é um dos mais estudados e importantes fatores do controle da pressão arterial e balanço hídrico (85, 90). Ao determinar o controle dinâmico da volemia e da resistência vascular periférica, o SRAA contribui significativamente para a homeostasia cardiovascular e pode ser visto como uma ferramenta disposta a partir da função renal uma vez que a produção de renina é precursora para a formação de angiotensina (85) (Figura 6).



**Figura 6** – Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e formação da angiotensina II (ANG II). São mostradas as etapas e estruturas envolvidas nos ajustes da pressão arterial passando pela função renal via aldosterona e vasopressina. Adaptado de Silverthorn, 2010. (91)

Sensores localizados em células da mácula densa são capazes de monitorar o fluxo tubular e os níveis de sódio e, a partir daí, controlam a produção de renina (92-93). O circuito metabólico até a formação da angiotensina II passa pelo fígado (produção de angiotensinogênio), os rins (renina), os pulmões (enzima conversora da angiotensina) (94-95). Este sistema implica na ativação de outros mediadores

como a aldosterona, ligada ao controle da reabsorção tubular de sódio, controle de volume e ajustes da osmolaridade e a vasopressina, com função de aumentar a reabsorção de água nas porções finais dos túbulos renais (92). O SRAA, na perspectiva do controle renal de sódio e água, integrados a reatividade vascular e centros de controle bulbares contribuem para a regulação da pressão arterial (68).

A grelina, por sua vez, pode apresentar interações com a angiotensina II (ANG II) em relação à ingestão de água e controle volêmico (92, 96). Fujimura e colaboradores sugeriram a ação protetora da grelina contra lesões induzidas pela angiotensina II via estresse oxidativo em camundongos (97). A grelina demonstrou ação antidipsogênica, diminuindo a ingestão de água induzida pela ANG II interferindo na volemia em ratos (98). Estas pesquisas mostram, portanto, que a interação grelina-GHS-R1a pode atuar além da busca por ingestão alimentar, ou seja, pode estar implicada no equilíbrio da função renal, na hemodinâmica e homeostasia cardiovascular, temas relevantes que norteiam o nosso trabalho.

### **1.7. Modelos experimentais para estudo da função renal**

Para avaliar o papel da função renal no cenário da hipertensão, vários modelos experimentais foram usados (68, 99). Kopf e colaboradores avaliaram a participação dos rins no processo hipertensivo através do transplante cruzado entre animais hipertensos e normotensos (100). Entre todos os modelos, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) produzidos a partir de colônias de ratos Wistar (WT) seletivamente endogâmicos, representam o modelo mais comparável à forma humana da hipertensão primária (101-102).

Os animais SHR apresentam retenção hídrica, aumento da resistência e reatividade vascular além da diminuição do lúmen das arteríolas em comparação com Wistar (101). Arendshorst e Beierwaltes (1979) mostraram que animais hipertensos necessitam de uma pressão arterial maior para excretar sódio e água (103), fato também estudado por Dibona (1978), a partir da expansão de volume infundido com alteração da reabsorção de sódio na alça de henle (104). Ledingham (1990) mostrou que SHRs apresentam aumento no apetite por sal e retenção de sódio no corpo (105). A natriurese de pressão está alterada mesmo em animais jovens (106). Harrap e Doyle (1986), inclusive, já haviam proposto que o aumento da resistência vascular renal é um dos fatores que altera a natriurese de pressão o que pode contribuir para hipertensão (55).

Dibona (1987) também avaliou a importância da atividade simpática renal e sua influência sobre a reabsorção de sódio (107). Anormalidade nesse mecanismo pode levar a retenção desse íon e aumentar a secreção de renina (68). Berecek (1979) estudou a maior reatividade às catecolaminas em SHRs propensos a acidente vascular cerebral, além do hormônio antidiurético e angiotensina (108). O remodelamento vascular provocado pela hipertensão é um dos fatores que determinam as diferenças em relação ao fluxo sanguíneo renal entre Wistar e SHR (109-111).

Roman (1988) avaliou o fluxo sanguíneo cortical e papilar em SHRs e sugeriu que a resistência vascular já está elevada em animais jovens e as alterações hemodinâmicas dos vasos retos podem contribuir para hipertensão (112). Para Fink (1979) a resistência ou hiperatividade não resulta de influência neurogênica da vasculatura renal pela noradrenalina ou angiotensina II (113).

Em suma, há um contexto ambivalente em que a disfunção renal pode ser a principal causa da hipertensão e, ao mesmo tempo, os rins sofrem lesões associadas ao quadro à medida que a hipertensão progride (114-116). Este fenômeno foi chamado de “ciclo vicioso de Klahr” (117). Alterações renais que resultam em prejuízos diuréticos como a perda de massa renal, esclerose glomerular entre outros reforçam esse ciclo (116). Não seria apenas o aspecto estrutural, mas também fisiológico que determinam o papel da função renal concomitantemente com uma gama imensa de substâncias vasoativas como prostaglandinas, óxido nítrico e os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Esses fatores são fundamentais para os ajustes pressóricos hemodinâmicos (118). A lesão vascular geral e renal pode induzir a produção alterada destas substâncias e comprometer as respostas adaptativas na regulação do volume e da homeostase do sódio (68, 116).

### 1.8. Hipertensão Arterial Sistêmica e função renal

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) representa um dos problemas de saúde mais incapacitantes e com graves repercussões fisiológicas (50, 119-120). É uma afecção crônica, diagnosticada pelos aumentos da pressão sistólica e diastólica acima de 140 e 90 mmHg respectivamente. São várias as hipóteses para sua deflagração, em 90% dos casos não há uma causa secundária clara sendo, neste caso, classificada como hipertensão essencial ou primária (48, 120-121). Quando existe uma causa além das condições cardiovasculares, a hipertensão é considerada secundária, o que pode ocorrer em alterações neuroendócrinas como síndrome de Cushing (Cortisol) ou hiperaldosteronismo (53) e durante estenose de artéria renal (84, 122). De toda maneira, em ambos os tipos de hipertensão, mecanismos renais indubitavelmente contribuem para a elevação dos níveis pressóricos (120).

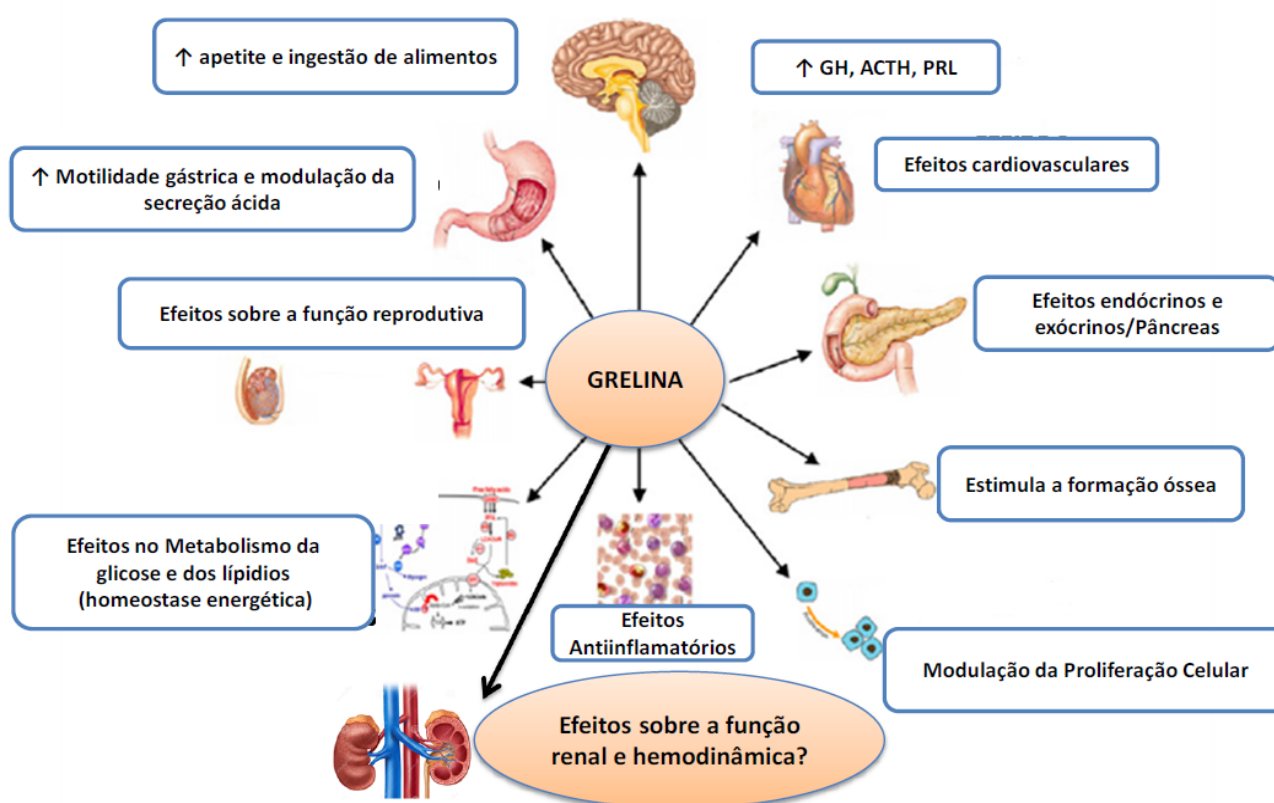
Neste contexto, a HAS pode ser provocada por alterações da capacidade dos rins em regular a natriurese por pressão (53, 121). Cowley, 1992 mostrou que o bloqueio da enzima conversora de angiotensina (ECA) teve efeito anti-hipertensivo por atuar também no controle da excreção de sal e água (123). A relação da função renal com o ajuste da pressão arterial remonta de longo período desde os experimentos de Tigerstedt e Bergman (1898) que provocaram o aumento da pressão arterial ao injetar renina na circulação sistêmica de animais (124). Guyton e colaboradores observaram que a vasoconstricção sistêmica não induz o aumento sustentado da pressão arterial se os rins estiverem funcionando (52). Goldblatt e colaboradores utilizaram grampos ou clips para promover a constricção das artérias renais e desencadeou hipertensão crônica (125). Outros autores propuseram que essa alteração acontece simultaneamente pelo comprometimento do ritmo de filtração glomerular, glomeruloesclerose, lesões vasculares e intersticiais tubulares (68, 107, 109, 113). A confrontação de hipóteses sugerindo a predominância de mecanismos autonômicos sobre os mecanismos vasculares e renais tem sido alvo de debates na literatura (114-115). Apesar disso, o papel decisivo da função renal no controle da pressão arterial e sua participação na fisiopatologia da HAS é um fato que não pode ser negligenciado.

### **1.9. Papel pleiotrópico da Grelina e dos receptores GHS-R1a**

A administração de GRE aumenta significativamente a ingestão de alimentos em animais e essa condição orexigênica parece ser independente do seu efeito estimulante na liberação do GH (10, 126). Por outro lado, os principais indutores que regulam os níveis de GRE são: níveis glicêmicos, a composição corporal, o gasto energético, jejum e as condições patológicas (10). Outros autores descrevem que, além dessas funções, a secreção gástrica e a motilidade intestinal seriam efeitos localizados sobre o sistema gastro-intestinal (SGI) (37, 127-128).

Por muito tempo o controle dessas funções metabólicas, principalmente o ritmo e sua regulação, conforme as demandas adaptativas impostas pelo ambiente foram esclarecidas através de eixos neuroendócrinos (129-130). O hipotálamo seria o centro modulador das atividades, recebendo informações de substratos metabólicos via corrente sanguínea e por aferências autonômicas (68, 120, 130). A descoberta da grelina, se não o único, mas o mais importante hormônio orexígeno, trouxe um redimensionamento desse controle (10, 126).

Todavia, esses efeitos tão citados ganham uma dimensão sistêmica ou pleiotrópica uma vez que a GRE pode ser produzida em vários órgãos, sendo especuladas neste trabalho as estruturas renais como medula e córtex renal bem como função hemodinâmica (ver figura 7). Assim, algumas ações fisiológicas estão sendo cada vez mais analisadas como, por exemplo, a interação com o controle da glicose, síndromes metabólicas, hipertensão, proliferação celular, função cardiovascular, renal, reprodutoras, memória, aprendizado e funções anti-inflamatórias (10, 29, 127).



**Figura 7** – Principais efeitos fisiológicos da Grelina com o questionamento sobre a função renal e hemodinâmica, grande eixo temático dessa pesquisa. Adaptação de Vriese e Delporte, 2007 (2).

Considerando as ações da Grelina em diferentes órgãos, é possível que tal hormônio seja um importante agente homeostático sistêmico, uma vez que é secretado na corrente sanguínea por células endócrinas oxínticas X/A-like da parede gástrica (como já citado) e intestino delgado proximal (2). Neste caso, especialmente em regiões com maior permeabilidade hematoencefálica, como o diencéfalo, a grelina alcança o sistema nervoso central (131). No âmbito de seus potenciais efeitos centrais, pode agir não somente em regiões que conhecidamente expressam GHS-R1a como o núcleo arqueado (ARC) (30, 132) e hipotálamo anterior por meio de aferentes vagais que trafegam passando pelo núcleo do trato solitário (NTS), mas também atua em neurônios do hipotálamo (núcleo paraventricular – PVN) (133) (Figura 8). Essa ação sobre tais regiões pode determinar respostas periféricas (44) que regulam a ingestão de alimentos, os níveis de glicose, lipídeos, proteínas e insulina, entre outros (134-136).

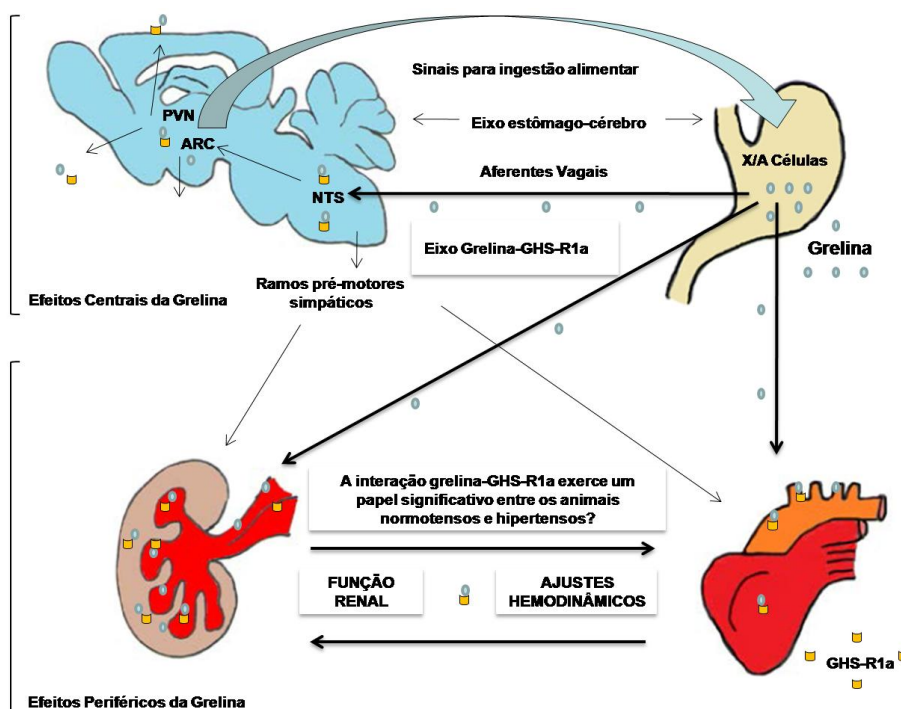
No que se refere aos efeitos periféricos, a grelina poderia influenciar:

a) Funções gastro-entero-pancreáticas, modulação da proliferação celular e desenvolvimento físico através de vias dependentes e independentes do hormônio do crescimento (GH) (137-138).

b) Na natriurese por pressão e na função renal (68, 116);

c) Efeitos na função cardiovascular tanto em mecanismos relacionados à hipertensão, cardioproteção miocárdica e contra injúrias ateroscleróticas e isquêmicas infartantes (139-140).

As lacunas, por outro lado, ainda estão presentes em relação às investigações sobre a repercussão renovascular e as respostas frente à interação grelina-GHS-R1a quanto à função renal e os ajustes compensatórios durante os quadros hipertensivos. Assim, as principais hipóteses levantadas neste trabalho são: i) a interação grelina-GHS-R1a apresentaria respostas diferentes quanto à função renal em relação à administração aguda de grelina e os agonistas e antagonistas dos receptores GHS-R1a em animais normotensos e hipertensos; ii) as respostas hemodinâmicas influenciadas pela interação grelina-GHS-R1a seriam diferentes entre os ratos normotensos (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR). Buscar mais informações acerca desse contexto científico é a proposta do presente trabalho. A figura 8 ilustra as hipóteses que nortearam a execução desse trabalho.



**Figura 8** – Possíveis repercussões da interação grelina-GHS-R1a que norteiam as principais hipóteses deste trabalho. Função renal e cardiovascular além do sistema nervoso central (setas finas) e estômago (setas grossas). GHS-R1a (Receptores secretagogos para o hormônio do crescimento), PVN (núcleo paraventricular, hipotálamo), ARC (núcleo arqueado) e NTS (núcleo do trato solitário). Fonte: Próprio autor.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1. Justificativa

A grelina faz parte de um contexto homeostático apresentando diversos efeitos com implicações locais e sistêmicas. Muitos estudos revelam como determinados tecidos e órgãos se comportam frente a sua administração central e/ou periférica numa tentativa de se estreitar o conhecimento do seu mecanismo de ação e, a partir daí, desvendar meios seguros de prevenção, tratamento e até mesmo diagnóstico de disfunções metabólicas. Esse hormônio poderia ser usado como um dos biomarcadores da função renal e de outros sistemas já que participa de funções diversas como relatado na revisão de literatura.

Todas essas ações e efeitos abrem um grande horizonte que justifica o estudo da grelina, a partir do qual, muitos alvos experimentais podem ser investigados. Ela representa umas das importantes peças do quebra cabeça fisiológico. Este estudo pretendeu avaliar as ações ligadas a interação grelina-GHS-R1a sobre a função e hemodinâmica renal e contribuir para a discussão da importância desse hormônio nos eventos fisiológicos de interesse clínico.

### 2.2. Objetivo geral

Investigar os efeitos da administração aguda de Grelina e o papel dos Receptores GHS-R1a no controle da função renal e hemodinâmica em animais normotensos e hipertensos.

### 2.3. Objetivos específicos

- 1) Investigar o papel da grelina e dos receptores GHS-R1a no controle da função renal de animais normotensos e hipertensos quanto a: Ingestão de ração (g), quantidade de fezes (g), ingestão de água (ml) e volume urinário (ml);
- 2) Investigar o papel da grelina e dos receptores GHS-R1a no controle da função renal de animais normotensos e hipertensos quanto a: Osmolaridade plasmática (mOsm), osmolaridade urinária (mOsm), clearance osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e clearance de água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ );

- 3) Investigar o papel da grelina e dos receptores GHS-R1a no controle da função renal de animais normotensos e hipertensos quanto a: Sódio [ $\text{Na}^+$ ] e Potássio [ $\text{K}^+$ ] plasmático e Urinário (mEq/L);
- 4) Investigar o papel da grelina e dos receptores GHS-R1a no controle da função renal de animais normotensos e hipertensos quanto a: Creatinina plasmática (mg/dL), Creatinina urinária (mg/dL), Creatinina urinária (mg/24horas) e Clearance de creatinina/peso (ml/min/Kg);
- 5) Avaliar os efeitos da administração aguda de grelina e a contribuição dos receptores GHS-R1a para controle da hemodinâmica (condutância vascular renal e aórtica);
- 6) Avaliar a expressão dos receptores de Grelina, GHS-R1a, na artéria aorta, artéria renal, medula renal e córtex renal de animais normotensos e hipertensos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar e SHR (ratos espontaneamente hipertensos), pesando entre 280-330g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram alojados em gaiolas individuais (47cm x 31cm x 16cm), em salas climatizadas (22-24 °C), com livre acesso (*ad libitum*) à água e ração e com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de uso de animais (141) e os protocolos experimentais amparados pela aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFG (protocolo 073/2015 - ANEXO I).

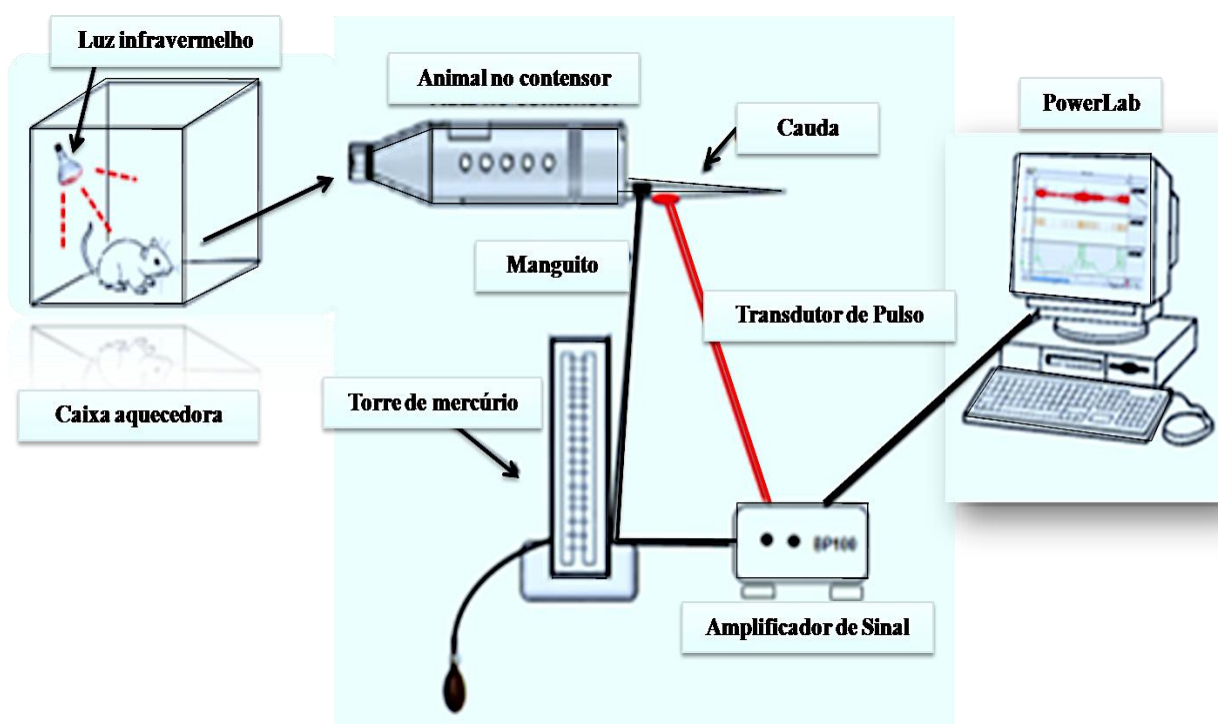
#### 3.2. Drogas e Reagentes

As principais drogas e reagentes utilizados foram:

- Salina isotônica/veículo (NaCl 0,9%), usada como controle (VEH);
- Heparina sódica (Liquemine, 5000U.I./mL – Roche Laboratories, Brasil);
- Kit de tiras reagentes para uroanálise Sensi 10® (Sensitive), lote 57140030;
- Padrões do osmômetro (100, 500 e 1500 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O – Prec.SystemInc, EUA);
- Padrão de sódio [Na<sup>+</sup>] 140 mEq/L e potássio [K<sup>+</sup>] 5mEq/L (Laborlab, Brasil);
- Kit Biotécnica® para dosagem de creatinina (Labtest, Brasil);
- Grelina de rato (Sigma Aldrich®): administrada nas doses 10 µg/kg (*in vivo*). As doses escolhidas foram baseadas em experimentos pilotos realizados no nosso laboratório e comparados a literatura relacionada;
- Antagonista de receptor GHS-R1a (PF-04628935/0,4mg/Kg) (Sigma, USA) e Agonista (MK0677) (10 µg/kg) (Sigma, USA).

### 3.3. Plestimografia de cauda

A plestismografia de cauda foi usada para confirmar os níveis de pressão arterial de animais hipertensos, como critério de inclusão para realização dos experimentos. Os animais passaram por um período prévio de adaptação a manipulação e contensão por 2 semanas. As medidas de pressão arterial, conforme descrito a seguir, foram realizadas 5 vezes por semana antes do início dos tratamentos (uma média dos valores de pressão arterial sistólica obtidos diariamente, foi calculada ao final do quinto dia). Para coletar as medidas, os animais foram alojados em uma caixa aquecedora com temperatura aproximada de 38°C durante 15 minutos para dilatação da artéria caudal (Figura 9). Na sequência, o animal foi colocado em caixa individual com maravalha e um manguito de borracha foi posicionado na base da cauda juntamente com um receptor de pulso, ambos acoplados a um transdutor e conectados ao sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/25, ML0380/D, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A partir da insuflação e desinsuflação do manguito em intervalos regulares determinou-se a PAS pela média aritmética de triplicata dos valores para o mesmo registro.



**Figura 9** – Esquema mostrando a sequência de procedimentos da plestimografia de cauda (142).

### 3.4. Desenho Experimental

#### 3.4.1. Experimento 1 – Papel da grelina e dos receptores GHS-R1a no controle da função renal de ratos normotensos (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR).

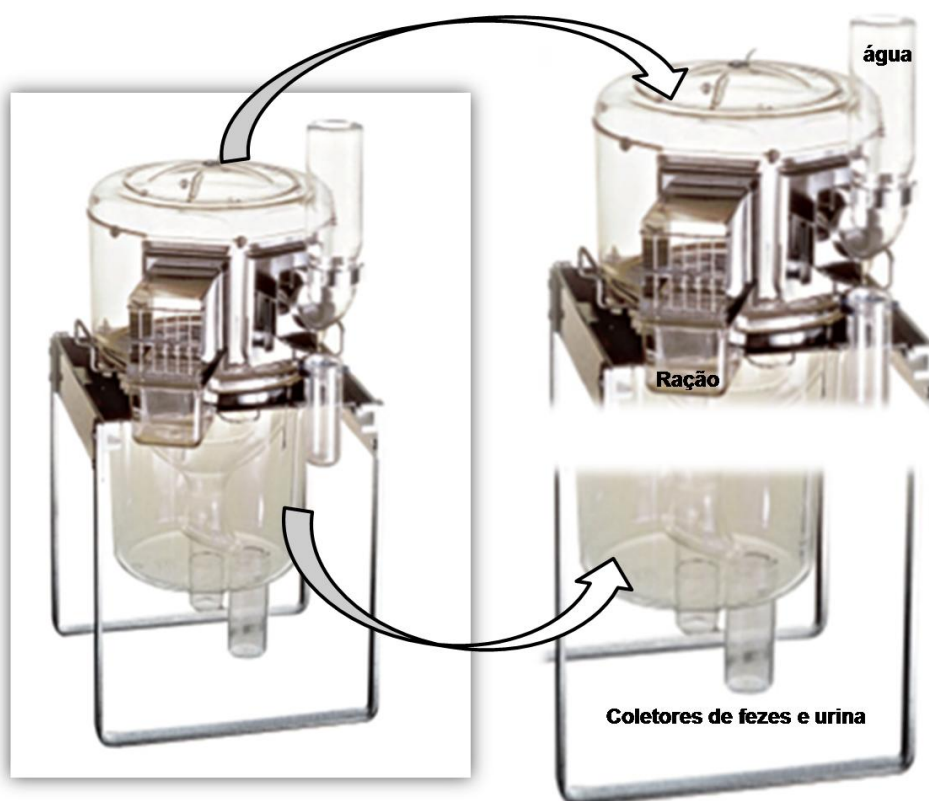
Para avaliar os efeitos da Grelina e da contribuição dos receptores GHS-R1a através do uso de agonista (MK0677) e antagonista (PF0462893), em relação à função renal, foram utilizados ratos normotensos (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR) pesando em média 280-330g e alojados em gaiola metabólica. Cada linhagem foi dividida em cinco grupos (com n=12 cada): veículo (VEH), Grelina (GRE), Grelina+antagonista (GRE+AT), antagonista (AT) e agonista (AGO) como mostrado na tabela 1.

**Tabela 1** – Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Grupo Normotensos/Wistar(WT)					Grupo Hipertensos (SHR)				
Tratamentos agudos (5 grupos; n=12 cada)					Tratamentos agudos (5 grupos; n=12 cada)				
VEH NaCl (0,9%)  n=12	GRE 10µg / Kg  n=12	GRE + AT 10µg / Kg + 0,4mg / Kg n=12	AT 0,4mg / Kg  n=12	AGO 10µg / Kg  n=12	VEH NaCl (0,9%)  n=12	GRE 10µg / Kg  n=12	GRE + AT 10µg / Kg + 0,4mg / Kg n=12	AT 0,4mg / Kg  n=12	AGO 10µg / Kg  n=12
Ratos foram submetidos a injeções subcutânea (s.c) de veículo <b>VEH</b> (NaCl 0,9%), Grelina ( <b>GRE</b> ) (10µg / Kg), grelina + PF0462893 antagonista de GHS-R1a AT - PF04628935 (0,4mg / Kg) ( <b>GRE+AT</b> ), antagonista de GHS-R1a - PF04628935 ( <b>AT</b> ) (0,4mg / Kg) ou agonista de GHS-R1a ( <b>AGO</b> ) (MK0677) (10µg / Kg) e mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas para posterior análise urinária e plasmática.									

Para avaliação dos parâmetros relacionados à função renal, os animais foram pesados e colocados em gaiolas metabólicas individuais (Figura 10), com livre acesso a ração e água. Após 24 horas de adaptação, as gaiolas foram lavadas, pesou-se a ração (50g) e mediu-se o volume de água (100 ml) para serem consumidas. Depois de mais 24 horas (Dia 0), foram separadas as amostras de urina para uranálise com tiras de reagentes colorimétricas para verificação do bom

estado renal do animal, analisando-se 10 parâmetros: Leucócitos, urobilinogênio, bilirrubina, sangue oculto, nitritos, Ph, densidade específica, proteína, glicose e cetonas. Também foram executadas as medidas de volume de água e peso da ração consumida, além da pesagem das fezes e medição de volume urinário. Em seguida, foi realizada a injeção subcutânea de veículo (NaCl 0,9%), grelina (GRE) (10 $\mu$ g / Kg), antagonista de GHS-R1a AT (PF04628935) (0,4mg / Kg), grelina + PF0462893 ou agonista de GHS-R1a AGO (MK0677) (10 $\mu$ g / Kg), conforme cada grupo estabelecido, e mantidos em gaiolas metabólicas para posterior análise urinária e plasmática.



**Figura 10** – Imagem do modelo de gaiola metabólica usada no estudo.

Posteriormente a injeção dos tratamentos planejados, foi realizada anestesia por animal com tribromoetanol (250mg/kg), seguida de deslocamentos cervical e abertura do tórax para realização de punção cardíaca. Foram coletados 3,0 ml de sangue de cada rato, com seringa heparinizada e colocados em microtúbulos de 2,0 ml, cada qual com 0,1ml de heparina 5000 U.L./ml. As amostras então foram

centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e o plasma foi separado em alíquotas de 2,0 ml sendo armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  em microtúbulos (eppendorf) para análise (Dia 1). A figura 11 mostra a representação esquemática da sequência experimental. As amostras de urina também foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado e aliqotado em 2 microtúbulos de 2,0 ml cada, armazenados a  $-80^{\circ}$  em microtúbulos (eppendorf).



**Figura 11** – Representação da sequência experimental.

Foram coletados e avaliados os seguintes parâmetros: Ingestão de ração, quantidade de fezes, Ingestão de água e volume urinário, Osmolaridade plasmática, Osmolaridade urinária, Clearance osmolar, Clearance de água livre, Concentração de Sódio e Potássio plasmático e urinário, Creatinina plasmática e urinária, Creatinina urinária 24 horas, Clearance de creatinina/peso (Parâmetros determinados através da análise da urina e do plasma dos ratos).

- **Determinação da Osmolaridade**

A determinação das osmolaridades plasmática e urinária foi realizada por osmometria de congelamento (Osmômetro Micro-Osmette TM, Precision Systems 5004 EUA). Para leitura, o osmômetro foi previamente calibrado utilizando soluções padrão, 100, 500 e 1500 mOsm. As amostras de urina foram diluídas 1:3 em água deionizada. A dosagem de cada amostra foi feita em duplicata. Em caso de grande diferença entre os resultados, realizou-se uma triplicata e foram considerados apenas os dois valores mais próximos entre si e estabelecido uma média aritmética destes.

Os seguintes cálculos foram realizados para a análise:

$$\text{Clearance osmolar } (\mu\text{L}/\text{min}) = \frac{\text{Osmolaridade urinária} \times (\text{Volume urinário}/1,44)}{\text{Osmolaridade plasmática}}$$

$$\text{Clearance osmolar/peso } (\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}) = \frac{\text{Clearance osmolar}}{\text{Peso (kg)}}$$

$$\text{Clearance de água livre } (\mu\text{L}/\text{min}) = (\text{Volume urinário}/1,44) - \text{Clearance osmolar}$$

- **Determinação da [Na<sup>+</sup>] e da [K<sup>+</sup>] plasmático e urinário**

As determinações de Na<sup>+</sup> e de K<sup>+</sup> nas amostras de plasma e urina foram realizadas por fotometria de chama utilizando padrão contendo 140 mEq/L de Na<sup>+</sup> e 5mEq/L de K<sup>+</sup> preparado em água deionizada. Os valores lidos a partir das amostras foram multiplicados pelo fator de diluição. A dosagem de cada amostra foi feita em duplicata.

- **Dosagens de creatinina plasmática e urinária**

Para as dosagens de creatinina plasmática e urinária foram feitas usando o Kit comercial Biotécnica® e a leitura de absorbâncias (Abs) foi realizada no espectrofotômetro Epoch™ de microplacas (BioTek®). A partir daí, realizou-se a leitura do padrão e das amostras em duplicata. O resultado final foi obtido através da média das duas absorbâncias. Os cálculos dos dados para creatinina conforme foram realizados conforme o Kit Biotécnica®:

\*Considerando:

FD: Fator de diluição = 50;

Concentração do padrão = 2 mg/Dl;

24 horas = 1440 minutos;

1Kg = 1000g.

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{(\text{Abs } 2 - \text{Abs } 1) \text{ da amostra} \times \text{Concentração do Padrão}}{(\text{Abs } 2 - \text{Abs } 1) \text{ do Padrão}}$$

$$\text{Creatinina urinária (mg/24h)} = \frac{\text{Creatinina urin. (mg/dL)} \times \text{FD} \times \text{Vol. Urin. (ml)}}{100}$$

$$\text{Clearance de Cr (ml/min)} = \frac{\text{Creatinina urin. (mg/dL)} \times \text{FD} \times \text{Vol. urin./min}}{\text{Creatinina plasmática (mg/dL)}}$$

$$\text{Clearance de Cr/peso (ml/min/kg)} = \frac{\text{Clearance de creatinina (ml/min)}}{\text{Peso (Kg)}}$$

**3.4.2. Experimento 2 – Investigação dos efeitos da administração aguda de grelina e do antagonista de GHS-R1a PF04628935 sobre a resposta hemodinâmica renal e aórtica: Registro da Pressão Arterial Média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Condutância Vascular Renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA).**

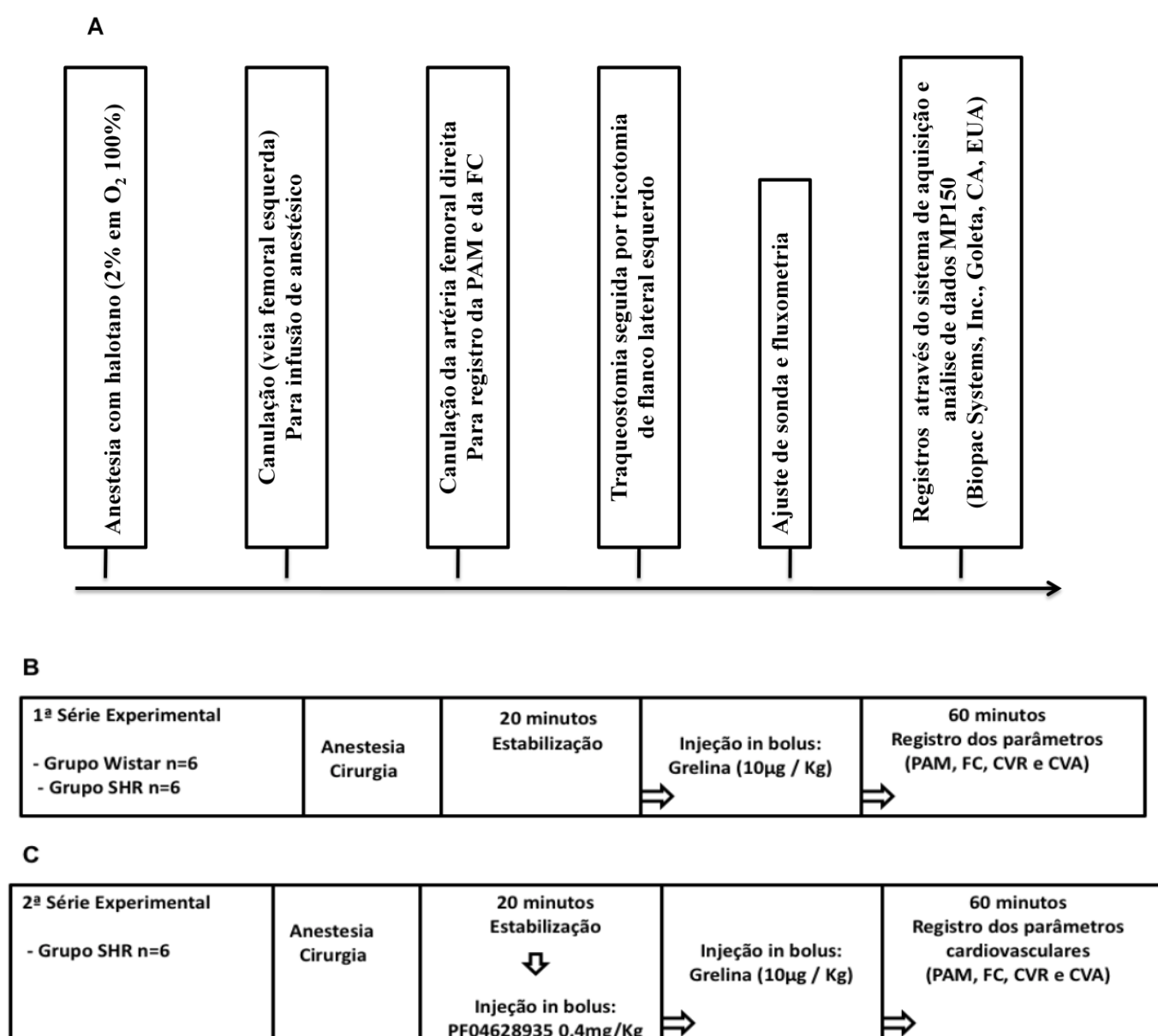
1ª Série Experimental	Grupo Normotenso/Wistar (WT) (n=6)	Grupo Hipertenso (SHR) (n=6)
	Administração <i>in bolus</i> de Grelina (10µg / Kg)	Administração <i>in bolus</i> de Grelina (10µg / Kg)
	Parâmetros avaliados: Pressão arterial média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Condutância vascular renal (CVR) e aórtica (CVA).	
2ª Série Experimental	Grupo Hipertenso (SHR) (n=6)	
	Administração <i>in bolus</i> PF04628935 – 0,4mg/Kg	Administração <i>in bolus</i> Grelina (10µg / Kg)
	Parâmetros avaliados: Pressão arterial média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Condutância vascular renal (CVR) e aórtica (CVA).	

**Figura 12** – Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados inicialmente com halotano (2% em O<sub>2</sub> 100%; halotano; Cristália, Itapira, SP, Brasil). A veia femoral direita foi canulada para a infusão do anestésico intravenoso tiopental (40 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A artéria femoral direita foi canulada para o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Posteriormente, foi realizada a traqueostomia, com o objetivo de evitar o esforço respiratório.

Após tricotomia no flanco lateral esquerdo, a região retroperitoneal foi exposta permitindo a visualização do rim esquerdo e da artéria renal. O fluxo sanguíneo renal

(FSR) e aórtico (FSA) foi registrado por fluxometria de tempo de trânsito como descrito por Welch (143). Para isso, uma sonda em miniatura foi conectada a um fluxômetro T206 (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA), que permite determinar o fluxo em valores absolutos ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados MP150 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 200 amostras por segundo. Durante todo o experimento, a temperatura retal será mantida entre 36 e 37°C com o auxílio de uma mesa térmica. A figura 12A E 12B resume a seqüência experimental.



**Figura 13** – Representação esquemática da seqüência experimental: (A) procedimentos gerais; (B) primeira série experimental: injeção de Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em WT e SHR; (C) segunda série experimental: injeção de PF04628935 (0,4 $\text{mg}/\text{kg}$ ) seguida de Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em SHR.

As condutâncias vasculares da artéria renal (CVR) e aórtica (CVA) foram obtidas pela razão entre o FSR e FSA e a PAM, respectivamente. Ver fórmula:

$$\%FS = \left[ \frac{FS \text{ final} - FS \text{ basal}}{FS \text{ basal}} \right] \times 100$$

A condutância vascular renal (CVR) e aórtica (CVA) foi obtida pela razão entre o FSR e a PAM, respectivamente. As repostas da CVR e CVA foram calculadas como variação percentual em relação ao valor basal (%CV), utilizando-se as seguintes fórmulas:

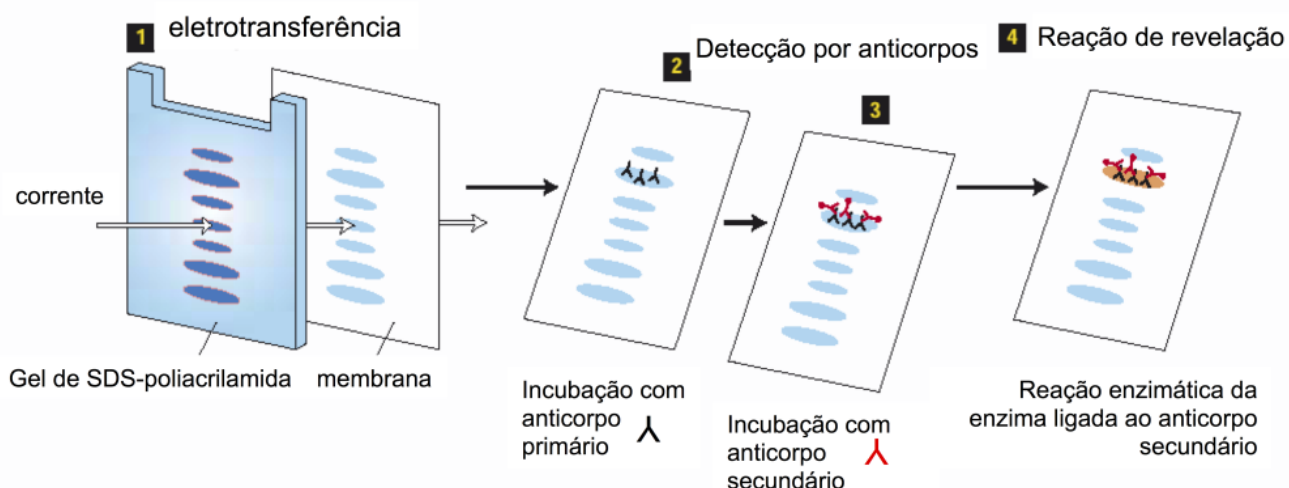
$$\%CV = \left[ \frac{CV \text{ final} - CV \text{ basal}}{CV \text{ basal}} \right] \times 100$$

Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares mínimo de 20 minutos, os animais normotensos e hipertensos foram submetidos à injeção intravenosa de veículo, Grelina (10 µg/kg) ou a combinação Grelina e antagonista de receptor GHS-R1a (PF-04628935) para os animais hipertensos. Os parâmetros foram acompanhados por um período mínimo de uma hora subsequente às injeções.

### **3.4.3. Experimento 3 – Expressão dos receptores GHS-R1a na artéria renal e aorta, no córtex e medula renal de ratos normotensos e hipertensos (Western Blot).**

As amostras das artérias renais e aorta além da medula e córtex renal foram coletadas para investigação da expressão dos receptores GHS-R1a (*Western blot*). A partir do tampão de extração [PSB (tampão fosfato-salino)] 1X, 1% Nonidet P40, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS (dodecil sulfato sódio) com inibidores de proteases (0,01% aprotinina, pepstatina, leupeptatina, PMSF, ortovanato de sódio e água q.s.p.) foram extraídas as proteínas. O homogenato foi incubado no gelo por 30 minutos, sonicados e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi retirado e o conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de

Bradford (144), sendo depois guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram preparadas, 40  $\mu\text{g}$  de cada uma foi pipetado em tubo identificado, acrescentando 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (Load) em água Milli-Q até completar o volume de 30  $\mu\text{L}$ .



**Figura 14** – Etapas básicas do *Western blot* para análise de expressão do GHS-R1a obtido de <https://laneurotox.net.br/imunoquimica> em 07/09/2018.

Através de eletroforese em gel acrilamida, figura 13, (concentração de 10% ou 15% dependendo do peso molecular das proteínas de interesse) as amostras foram fracionadas e corridas a 100 volts por, aproximadamente, 2 horas e 30 minutos a 120 volts e com temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Então, essa membrana foi corada com Ponceau 0,5% para certificar a eficiência da corrida e da transferência, lavada com TBST e incubada com leite 5% por uma hora para reduzir de acontecer ligações inespecíficas com o anticorpo para GHS-R1a. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo primário de interesse (overnight) e com anticorpo secundário comercial por uma hora e meia e foi revelada com ECL. As bandas foram analisadas pelo software J e a expressão das proteínas foi demonstrada de forma relacionada ao grupo controle (WT) com valor atribuído igual a 1. As proteínas analisadas por essa técnica e as respectivas concentrações dos anticorpos utilizados foram: Catalase (LifespanBioscience) 1:4000, ERK1/2 (CellSignaling) 1:1000, SOD (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000, MMP2 (Cusabio) 1:1000 e MMP-9 (Boster) 1:1000.

### 3.5. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism7.0 (GraphPad Software, Inc.). Os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores foram analisados usando análise de variância de duas vias (ANOVA Two-Way; Fatores: Linhagem/drogas para função renal e Linhagem/tempo para avaliação hemodinâmica), seguida pelo pós-teste de Tukey. As comparações da expressão de GHS-R1a entre o WT e SHR foram feitas utilizando One-Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

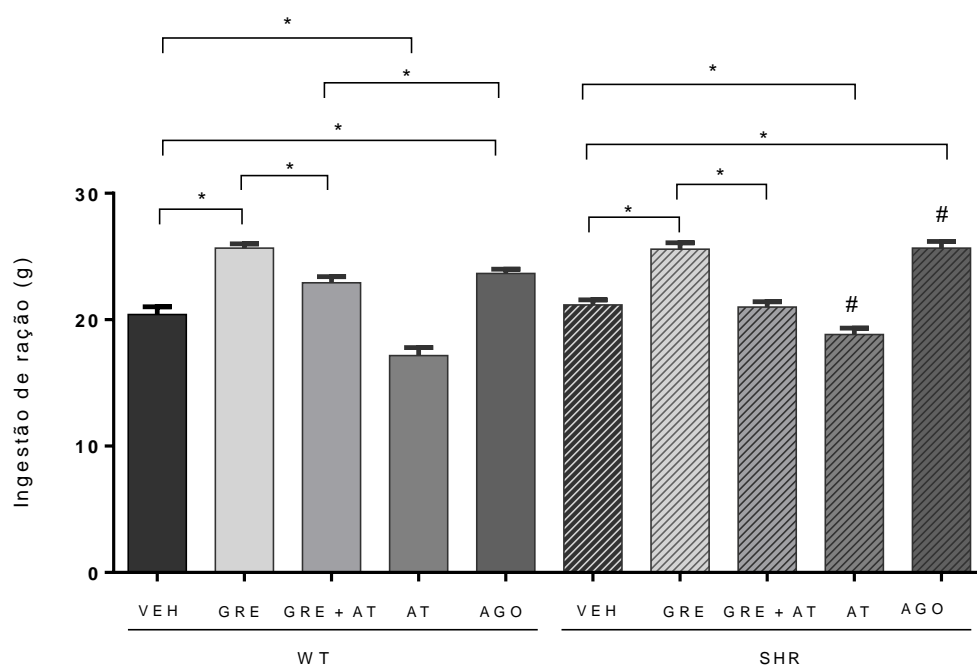
## 4- RESULTADOS

Antes da execução das avaliações experimentais, a PAS foi avaliada por plestismografia de cauda para confirmar a hipertensão dos SHRs. A média dos valores obtidos (SHR:  $194 \pm 7$  mmHg) revelaram a hipertensão.

### 4.1. Quantidade de ingestão de ração (g), produção de fezes (g), ingestão de água (ml) e volume urinário (ml).

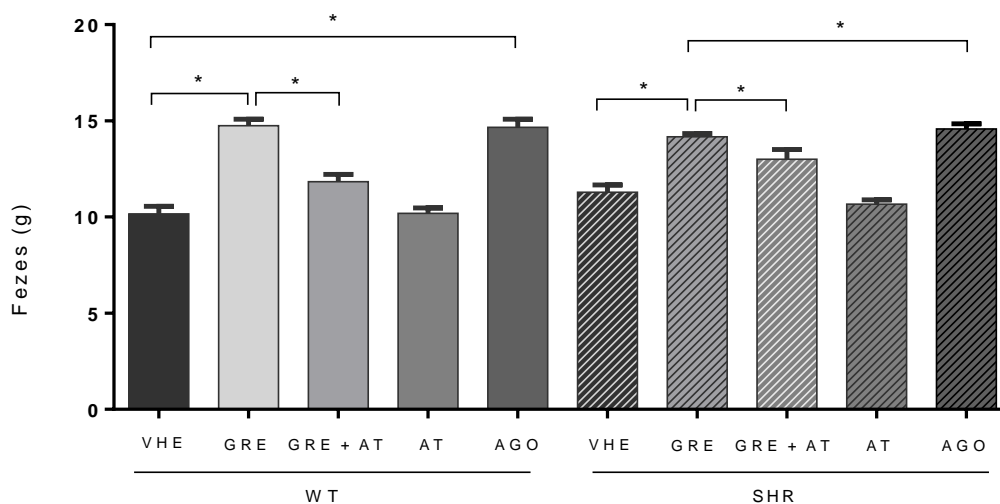
**- Ingestão de ração (g) (Figura 15)** - Em WT, GRE aumentou o consumo de ração (GRE:  $25,7 \pm 0,3$  vs. VEH:  $20,4 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ), assim como observado para o agonista dos receptores GHS-R1a (AGO:  $23,7 \pm 0,3$  vs. VEH:  $20,4 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, a administração concomitante do antagonista de GHS-R1a (PF04628935) com a GRE reverteu o aumento na ingestão de ração provocado pela GRE (GRE:  $25,7 \pm 0,3$  vs. GRE+AT:  $22,0 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). A injeção do antagonista de GHS-R1a reduziu a ingestão de ração (AT:  $17,1 \pm 0,6$  vs. VEH:  $20,4 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Os efeitos da Grelina sobre a ingestão de ração em SHR (GRE:  $25,6 \pm 0$  vs. VEH:  $21,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) foram similares aos observados em WT, inclusive para o agonista de GHS-R1a (AGO:  $25,7 \pm 0,5$  vs. VEH:  $21,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) e (AT:  $18,0 \pm 0,5$  vs. VEH:  $21,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ).

Também como descrito em WT, a administração concomitante do antagonista de GHS-R1a (PF04628935) com a GRE reverteu o aumento na ingestão de ração provocado pela GRE (GRE:  $25,6 \pm 0,5$  vs. GRE+AT:  $21,0 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Os efeitos do antagonismo e do agonismo de GHS-R1a com PF04628935 e MK0677, respectivamente, estão aumentados nos animais hipertensos quando comparadas as linhagens (SHR vs. WT) (AT:  $20,8 \pm 0,5$  vs. AT:  $17,1 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ) e (SHR vs. WT) (AGO:  $25,7 \pm 0,5$  vs. AGO:  $23,7 \pm 0,3$ ). A ingestão de alimentos, neste caso, aumentou em WT e SHR e tais efeitos foram revertidos pela injeção concomitante de Grelina com o antagonista do GHS-R1a sugerindo a participação desse receptor na modulação da ingestão alimentar e no balanço energético.



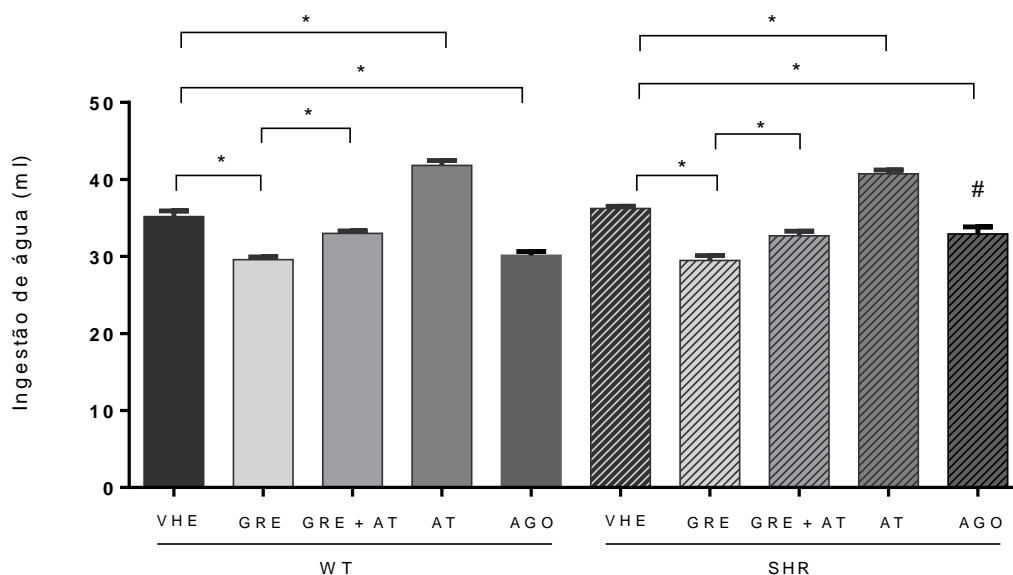
**Figura 15** – Comparação da ingestão de ração (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

- **Quantidade de fezes (g) (Figura 16)** - Em WT, GRE e o agonista de GHS-R1a aumentaram a quantidade das fezes quando comparados ao veículo (GRE:  $14,8 \pm 0,3$  vs. VEH:  $10,1 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ); (AGO:  $14,8 \pm 0,3$  vs. VEH:  $10,1 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, a administração concomitante do antagonista de GHS-R1a (PF04628935) com a GRE, reverteu o aumento da quantidade de fezes provocado pela GRE (GRE:  $14,8 \pm 0,3$  vs. GRE+AT:  $11,8 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Esse resultado foi semelhante para os SHR (GRE:  $14,2 \pm 0,2$  vs. VEH:  $11,3 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) e (AGO:  $14,6 \pm 0,2$  vs. VEH:  $11,3 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ), inclusive para a reversão do efeito após a administração concomitante com antagonista de GHS-R1a (GRE:  $14,2 \pm 0,2$  vs. GRE+AT:  $13,0 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ).



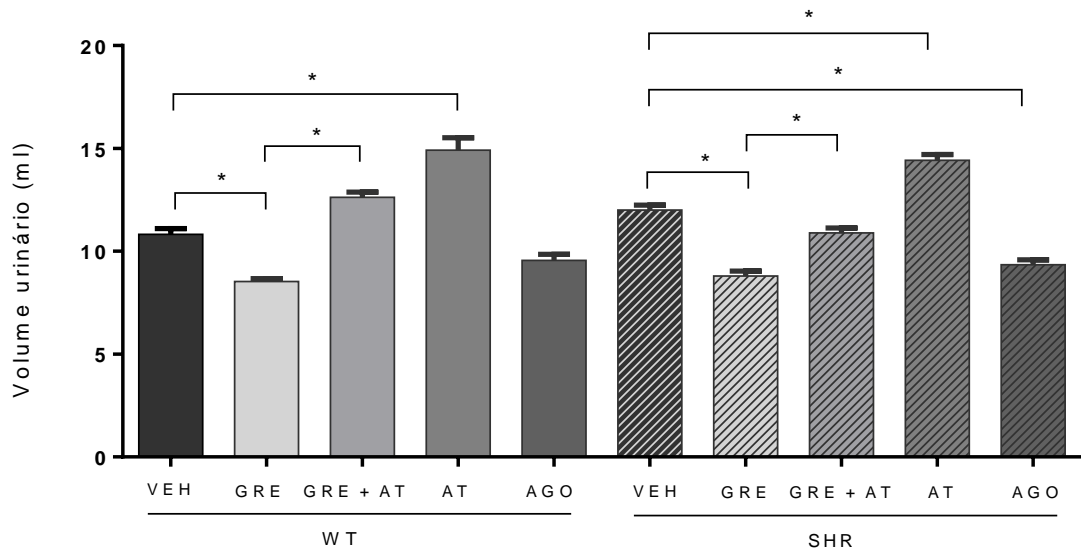
**Figura 16** – Comparação da quantidade de fezes (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

- **Ingestão de água (ml) (Figura 17)** – Em WT, GRE reduziu a ingestão de água (GRE:  $29,6 \pm 0,4$  vs. VEH:  $35,17 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ), o que também foi observado para o agonista dos receptores GHS-R1a (AGO:  $30,2 \pm 0,5$  vs. VEH:  $35,17 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). Tal efeito foi revertido pela administração concomitante da GRE com o AT (GRE:  $29,6 \pm 0,4$  vs. GRE+AT:  $33,0 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ). O antagonista dos receptores GHS-R1a aumentou a ingestão de água (AT:  $41,83 \pm 0,6$  vs.  $35,17 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). Tais respostas foram semelhantes nos animais hipertensos (SHR) (GRE:  $29,5 \pm 0,6$  vs. VEH:  $36,25 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ); (AGO:  $32,1 \pm 1,0$  vs. VEH:  $36,25 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ); (GRE:  $29,5 \pm 0,6$  vs. GRE+AT:  $32,5 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) e (AT:  $40,7 \pm 0,5$  vs. VEH:  $36,25 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ). A resposta à injeção do agonista diferiu entre as linhagens (AGO – WT:  $32,1 \pm 0,1$  vs. SHR:  $30,2 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 17** – Comparação da ingestão de água (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina -  $10\mu\text{g}/\text{Kg}$  (GRE); Grelina ( $10\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 -  $0,4\text{mg}/\text{Kg}$  (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 -  $0,4\text{mg}/\text{Kg}$  (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 -  $10\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AGO). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \*vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

- **Volume urinário (ml) (Figura 18)** - O volume urinário foi reduzido em WT e SHR injetados com GRE, (WT - GRE:  $8,5 \pm 0,1$  vs. VEH:  $10,83 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) (SHR - GRE:  $8,8 \pm 0,2$  vs. VEH:  $12,0 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ), o que também foi observado para AGO somente em SHR (AGO:  $9,34 \pm 0,2$  vs. VEH:  $12,0 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ). Esses efeitos evocados pela GRE foram revertidos pelo tratamento GRE+AT também nas duas linhagens (WT - GRE:  $8,5 \pm 0,1$  vs. GRE+AT:  $12,6 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ) e (SHR - GRE:  $8,8 \pm 0,2$  vs. GRE+AT:  $10,9 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ). O antagonismo dos receptores GHS-R1a com PF04628935 aumentou o volume urinário nas duas linhagens, normotensos (AT:  $14,9 \pm 0,6$  vs. VEH:  $10,83 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) e hipertensos (SHR) (AT:  $14,4 \pm 0,3$  vs. VEH:  $12,0 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 18** – Comparação do volume urinário (ml) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

**Sumário com os resultados:** Ingestão de ração e água, fezes e volume urinário.

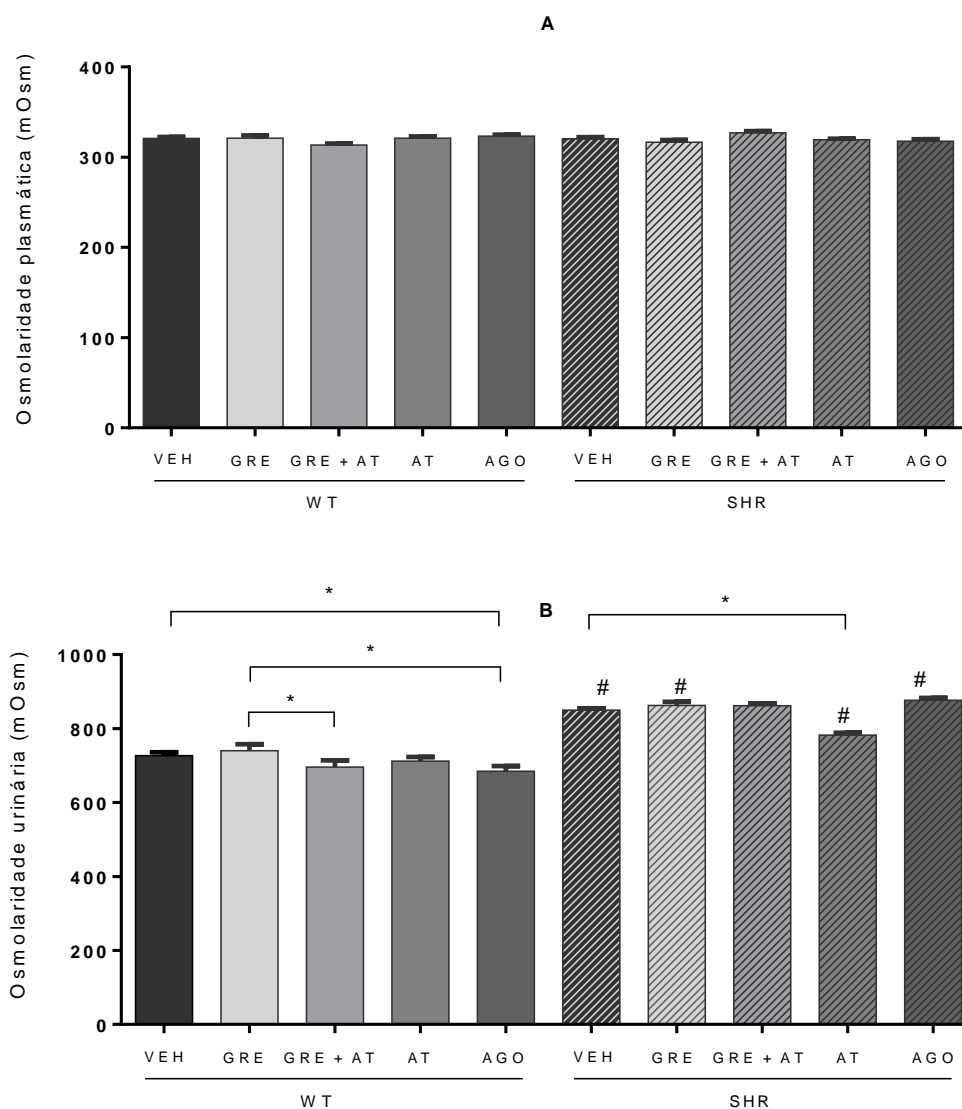
**Tabela 2.** Síntese dos resultados das comparações da ingestão de ração (g), quantidade de fezes (g), ingestão de água (ml) e volume urinário (ml) dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (<sup>†</sup>vs. veículo) e SHR x VEH (<sup>‡</sup> vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (<sup>#</sup> vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg / Kg (GRE); Grelina (10µg / Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg / Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg / Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg / Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Análise através de Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. <sup>\*</sup>vs. veículo; <sup>#</sup>vs. mesmo tratamento. <sup>\*</sup> ↑ = Aumento significativo; <sup>\*</sup> ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05.

<b>WISTAR X VEH (<sup>†</sup>vs.veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Ingestão de Ração (g)	*↑	—	*↓	*↑	
Fezes (g)	*↑	—	—	*↑	
Ingestão de água (ml)	*↓	—	*↑	*↓	
Volume Urinário (ml)	*↓	—	*↑	—	
<b>SHR X VEH (<sup>‡</sup>vs.veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Ingestão de Ração (g)	*↑	—	*↓	*↑	
Fezes (g)	*↑	—	—	—	
Ingestão de água (ml)	*↓	—	*↑	*↓	
Volume Urinário (ml)	*↓	—	*↑	*↓	
<b>WISTAR X SHR (<sup>#</sup> vs. mesmo tratamento)</b>	<b>VEH</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>
Ingestão de Ração (g)	—	—	—	#↑	#↑
Fezes (g)	—	—	—	—	—
Ingestão de água(ml)	—	—	—	—	#↑
Volume urinário (ml)	—	—	—	—	—

#### 4.2. Osmolaridade plasmática (mOsm), osmolaridade urinária (mOsm), clearance osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e clearance de água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )

- **Osmolaridade plasmática (mOsm) e osmolaridade urinária (mOsm) (Figura 19A e B)** - A osmolaridade plasmática não foi afetada por nenhum dos tratamentos e não diferiu entre grupos normotensos e hipertensos (Figura 19A). Nos animais WT a osmolaridade urinária mostrou-se significativamente reduzida frente ao agonista GHS-R1a (AGO:  $684,3 \pm 14,6$  vs. VEH:  $726,5 \pm 9,2$ ;  $p < 0,05$ ). De maneira interessante, o antagonismo de GHS-R1a reduziu a osmolaridade urinária somente de SHR (AT:  $782,5 \pm 5,6$  vs. VEH:  $849,4 \pm 4,8$ ;  $p < 0,05$ ), demonstrando o possível papel desse receptor na fisiopatologia da condição hipertensiva.

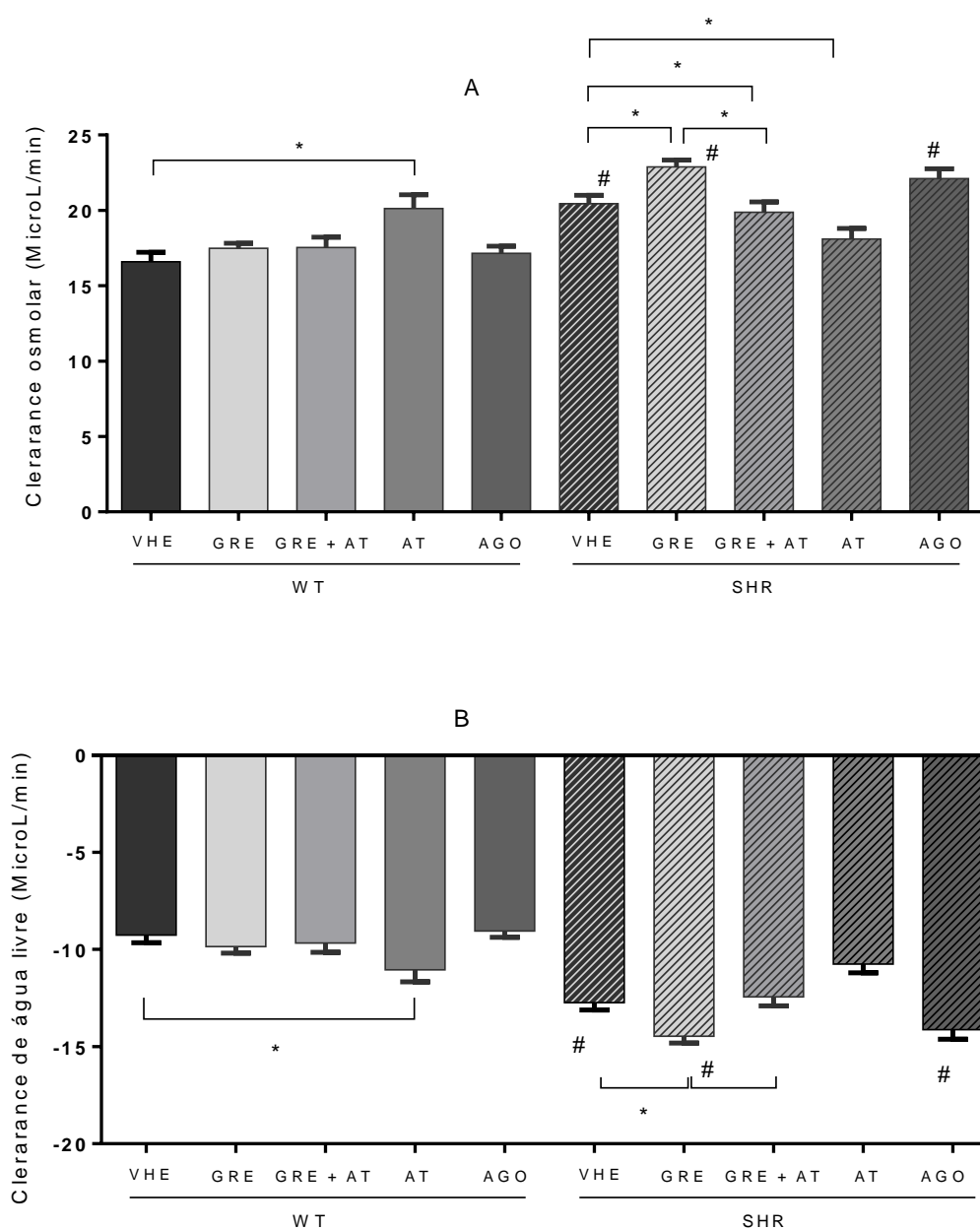
A reversão da resposta pelo tratamento GRE+AT só foi observada em WT (GRE:  $740,3 \pm 9,2$  vs. GRE+AT:  $696,1 \pm 9,2$ ;  $p < 0,05$ ). Na comparação com WT submetidos ao mesmo tratamento, SHR injetados com GRE, AT e AGO apresentaram níveis mais elevados de osmolaridade urinária (VEH:  $849,4 \pm 4,8$  vs. VEH:  $726,5 \pm 9,2$ ); (GRE:  $862,5 \pm 10$ , vs. GRE:  $740,3 \pm 17,2$ ); (AT:  $782,5 \pm 5,6$  vs. AT:  $712,0 \pm 11,2$ ) e (AGO:  $876,6 \pm 6,6$  vs. AGO:  $684,0 \pm 14,6$ ) para  $p < 0,05$  (Figura 19B).



**Figura 19** – Comparação da osmolaridade plasmática (mOsm) (A) e comparação da osmolaridade urinária (mOsm) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina – 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

- **Clearance osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) (Figura 20A)** – O clearance osmolar apresentou-se aumentado em SHR injetados com veículo, quando comparado ao WT (SHR:  $20,43 \pm 0,5$  vs. WT:  $16,6 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Ainda na comparação entre as linhagens, para o mesmo tratamento, houve um aumento significativo nos animais hipertensos (SHR) para: (GRE:  $22,8 \pm 0,5$  vs. GRE:  $17,5 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) e (AGO:  $22,11 \pm 0,6$  vs. AGO:  $17,15 \pm 0,5$ ). A injeção de GRE aumentou o clearance osmolar somente em SHR (GRE:  $22,8 \pm 0,5$  vs. VEH:  $20,43 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ), o que foi revertido pela sua coadministração com o antagonista de GHS-R1a (GRE:  $22,8 \pm 0,5$  vs. GRE + AT:  $19,8 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). A administração do antagonista de GHS-R1a aumentou o clearance osmolar em WT (AT:  $20,13 \pm 0,9$  vs. VEH:  $16,6 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ), ao passo que tal tratamento reduziu este parâmetro em SHR (AT:  $18,1 \pm 0,7$  vs. VEH:  $20,43 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ).

- **Clearance de água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) (20B)** – O clearance de água foi alterado em SHR quando comparado com WT injetados com veículo (SHR:  $-12,74 \pm 0,4$  vs. WT:  $-9,26 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Os valores do clearance de água dos SHR tratados com GRE (SHR:  $-14,5 \pm 0,3$  vs. WT:  $-9,8 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) e AGO (SHR:  $-14,12 \pm 0,5$  vs. WT:  $-9,0 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) foram significativamente diferentes dos parâmetros obtidos em WT. O antagonista (AT/PF04628935) aumentou a negatividade em normotensos (WT) (AT:  $-9,3 \pm 0,4$  vs. VEH:  $-11,4 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ) sendo a única resposta deste grupo. A injeção de GRE aumentou o clearance de água somente em SHR (GRE:  $-14,5 \pm 0,3$  vs. VEH:  $-12,74 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). O efeito da GRE em SHR foi revertido pela sua coadministração com AT (GRE:  $-14,46 \pm 0,3$  vs. GRE+AT:  $-12,4 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 20**– Comparação do Clearance osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) (A) e comparação do Clearance de água ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina -  $10\mu\text{g}/\text{Kg}$  (GRE); Grelina ( $10\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 -  $0,4\text{mg}/\text{Kg}$  (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 -  $0,4\text{mg}/\text{Kg}$  (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 -  $10\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AGO). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

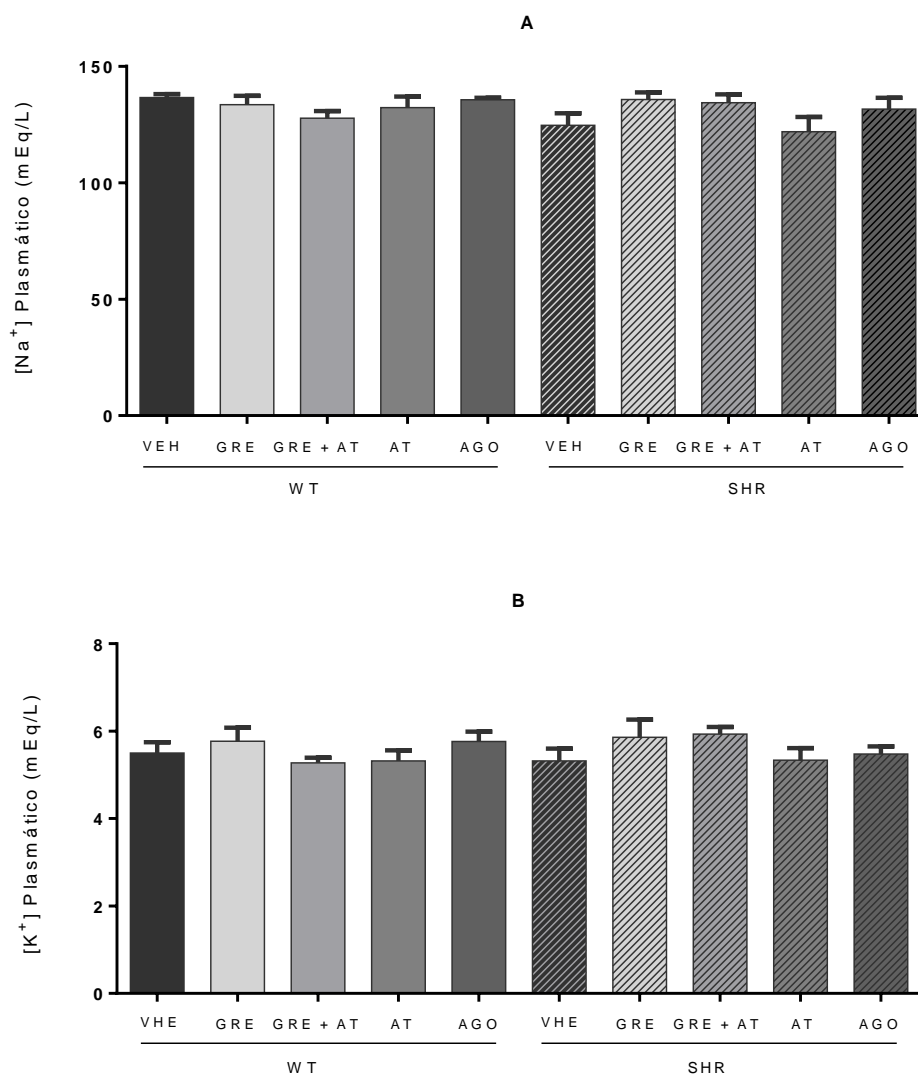
**Sumário com os resultados:** Osmolaridade plasmática e urinária, clearance osmolar e clearance de água livre.

**Tabela 3.** Síntese dos resultados das comparações da osmolaridade plasmática (mOsm), osmolaridade urinária (mOsm), clearance osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e clearance da água ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH ( $\checkmark$  vs. veículo) e SHR x VEH ( $\checkmark$  vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR ( $\#$  vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (GRE); Grelina (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$  (AGO). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média. Análise através de Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey.  $\checkmark$  vs. veículo;  $\#$  vs. WT mesmo tratamento.  $\ast\uparrow$  = Aumento significativo;  $\ast\downarrow$  = Diminuição significativa; - sem alteração significativa;  $p < 0,05$ .

<b>WISTAR X VEH (<math>\checkmark</math> vs. veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Osmolaridade Plasmática (mOsm)	—	—	—	—	
Osmolaridade Urinária (mOsm)	—	—	—	$\ast\downarrow$	
Clearance Osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	—	—	$\ast\uparrow$	—	
Clearance da água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	—	—	$\ast\downarrow$	—	
<b>SHR X VEH (<math>\checkmark</math> vs. veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Osmolaridade Plasmática (mOsm)	—	—	—	—	
Osmolaridade Urinária (mOsm)	—	—	$\ast\downarrow$	—	
Clearance Osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$\ast\uparrow$	$\ast\downarrow$	$\ast\downarrow$	—	
Clearance da água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$\ast\downarrow$	—	—	—	
<b>WISTAR X SHR (<math>\#</math> vs. mesmo tratamento)</b>	<b>VEH</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>
Osmolaridade Plasmática (mOsm)	—	—	—	—	—
Osmolaridade Urinária (mOsm)	$\# \uparrow$	$\# \uparrow$	—	$\# \uparrow$	$\# \uparrow$
Clearance Osmolar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$\# \uparrow$	$\# \uparrow$	—	—	$\# \uparrow$
Clearance da água livre ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$\# \downarrow$	$\# \downarrow$	—	—	$\# \downarrow$

### 4.3. Sódio [Na<sup>+</sup>] e Potássio [K<sup>+</sup>] plasmático e Urinário (mEq/L)

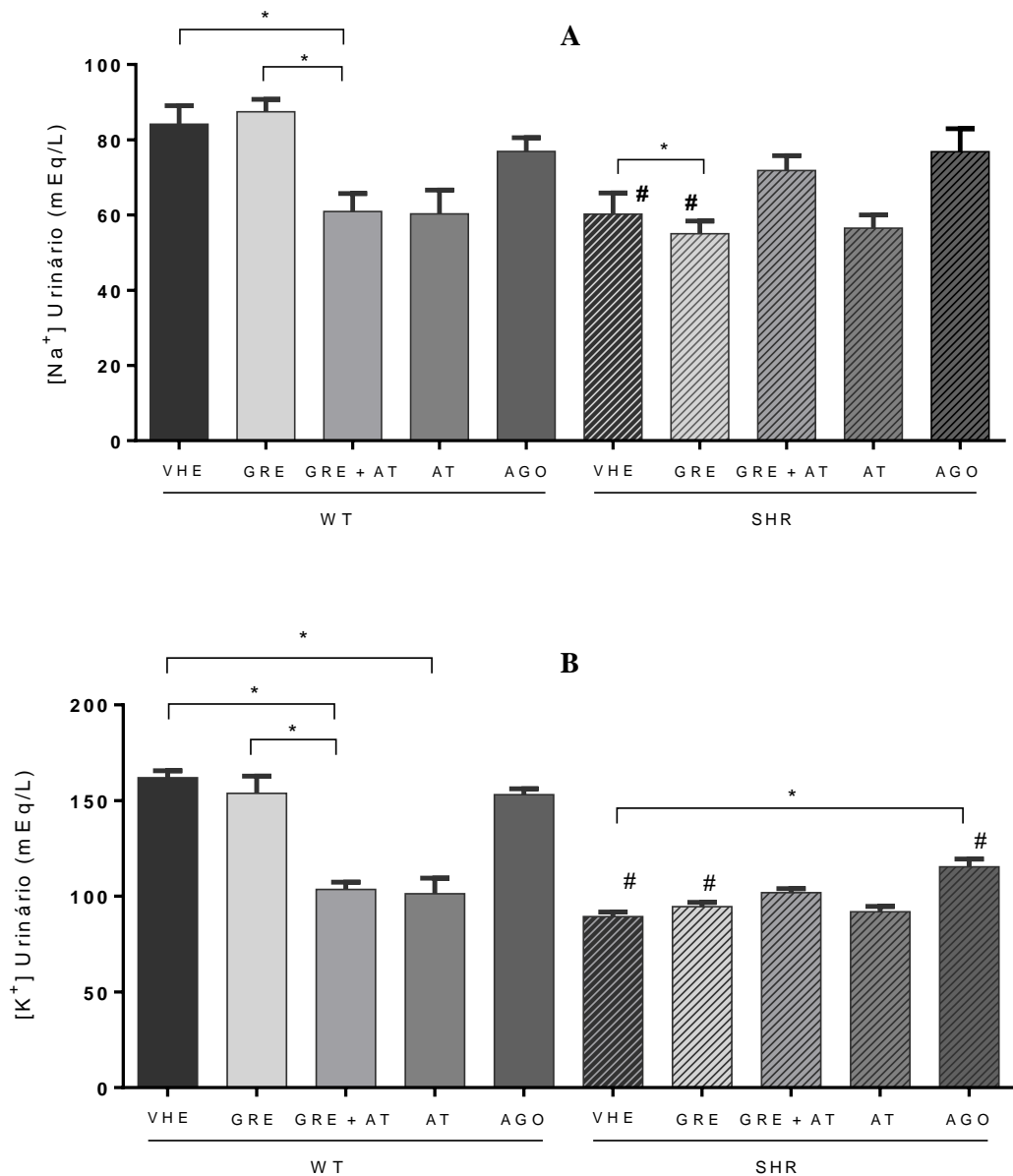
- **Sódio [Na<sup>+</sup>] e Potássio [K<sup>+</sup>] plasmáticos (mEq/L) (Figura 21A e B)** - As concentrações plasmáticas de sódio [Na<sup>+</sup>] e potássio [K<sup>+</sup>] não apresentaram mudanças significativas entre as linhagens para as injeções de VEH, GRE, GRE+AT, AT e AGO (Figuras 21 A e B, respectivamente).



**Figura 21** – Comparação da concentração de sódio [Na<sup>+</sup>] e [K<sup>+</sup>] plasmático (mEq/L) (A-B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg / Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

- **Sódio [Na<sup>+</sup>] e Potássio [K<sup>+</sup>] Urinários (mEq/L) (Figura 22A e 22B)** - Em animais normotensos (WT), os níveis de sódio urinário foram significativamente maiores quando comparados com aqueles obtidos em SHR injetados com veículo (SHR:  $60,25 \pm 5,0$  vs. WT:  $84,17 \pm 5,0$ ;  $p < 0,05$ ). A injeção de GRE não modificou os níveis de sódio urinário de WT, diferentemente do observado em SHR (GRE:  $55,0 \pm 0,3$  vs. VEH:  $60,2 \pm 5,0$ ;  $p < 0,05$ ). A coadministração de GRE com o AT reduziu de maneira significativa os níveis de sódio urinário de WT (GRE+AT:  $60,1 \pm 0,5$  vs. VEH:  $84,17 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ).

Os níveis de potássio urinário foram significativamente menores em SHR quando comparados ao seu respectivo controle (WT) injetado com veículo (SHR:  $89,4 \pm 4$  vs. WT:  $162,0 \pm 3,0$ ;  $p < 0,05$ ). Os níveis de potássio foram diferentes entre WT e SHR após injeções de GRE (SHR:  $94,6 \pm 2,0$  vs. WT:  $153,8 \pm 9,0$ ;  $p < 0,05$ ) e do AGO (SHR:  $115,4 \pm 4,0$  vs. WT:  $153,1 \pm 3,0$ ;  $p < 0,05$ ). A injeção de Grelina não modificou o potássio urinário em WT e SHR. Entretanto, a injeção combinada de GRE + AT reduziu os níveis de potássio urinário somente em WT (GRE+AT:  $103,6 \pm 3,0$  vs. VEH:  $162,0 \pm 3$ ;  $p < 0,05$ ), tal como ocorreu para o tratamento somente com AT (VEH:  $162,0 \pm 3$  vs. AT:  $101 \pm 8,2$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 22** – Comparação da concentração de sódio [Na<sup>+</sup>] e [K<sup>+</sup>] urinário (mEq/L) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 – 10µg /Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

**Sumário com os resultados:** Sódio [Na<sup>+</sup>] e Potássio [K<sup>+</sup>] plasmáticos e urinários (mEq/L).

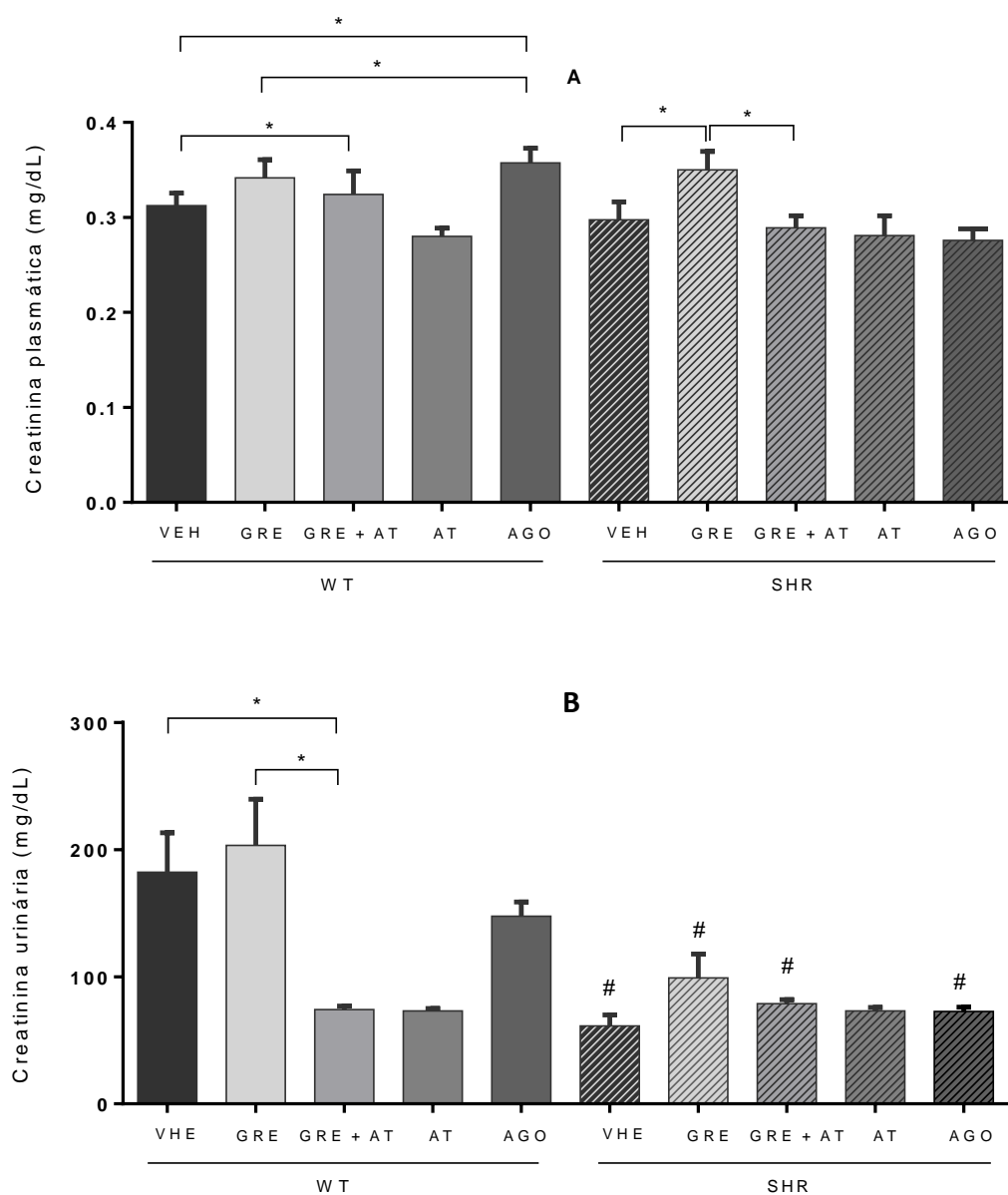
**Tabela 4.** Síntese dos resultados das comparações das concentrações de sódio e potássio plasmático e urinário (mEq/L) dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (<sup>†</sup>vs. veículo) e SHR x VEH (<sup>†</sup>vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (<sup>#</sup>vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg / Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg / Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Análise através de Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. <sup>\*</sup> vs. veículo; <sup>#</sup> vs. mesmo tratamento. <sup>\*</sup> ↑ = Aumento significativo; <sup>\*</sup> ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05.

<b>WISTAR X VEH (<sup>†</sup>vs.veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Sódio Plasmático [Na <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	—	
Sódio Urinário [Na <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	*↓	—	—	
Potássio Plasmático [K <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	—	
Potássio Urinário [K <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	*↓	*↓	—	
<b>SHR X VEH (<sup>†</sup>vs.veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Sódio Plasmático [Na <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	—	
Sódio Urinário [Na <sup>+</sup> ] (mEq/L)	*↓	—	—	—	
Potássio Plasmático [K <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	—	
Potássio Urinário [K <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	*↑	
<b>WISTAR X SHR (<sup>#</sup>vs. mesmo tratamento)</b>	<b>VEH</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>
Sódio Plasmático [Na <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	—	—
Sódio Urinário [Na <sup>+</sup> ] (mEq/L)	#↓	#↓	—	—	—
Potássio Plasmático [K <sup>+</sup> ] (mEq/L)	—	—	—	—	—
Potássio Urinário [K <sup>+</sup> ] (mEq/L)	#↓	#↓	—	—	#↓

#### **4.4. Creatinina plasmática (mg/dL), Creatinina urinária (mg/dL), Creatinina urinária (mg/24horas) e Clearance de creatinina/peso(ml/min/Kg)**

- **Creatinina plasmática (mg/dL) (Figura 23A)** – Os níveis de creatinina plasmática não diferiram entre WT e SHR. A injeção de grelina não afetou esse parâmetro em normotensos (WT). Enquanto a GRE aumentou os níveis de creatinina plasmática somente em SHR (GRE:  $0,35 \pm 0,01$  vs. VEH:  $0,29 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ), a injeção de AGO aumentou tais níveis apenas em WT (AGO:  $0,35 \pm 0,01$  vs. VEH:  $0,31 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ).

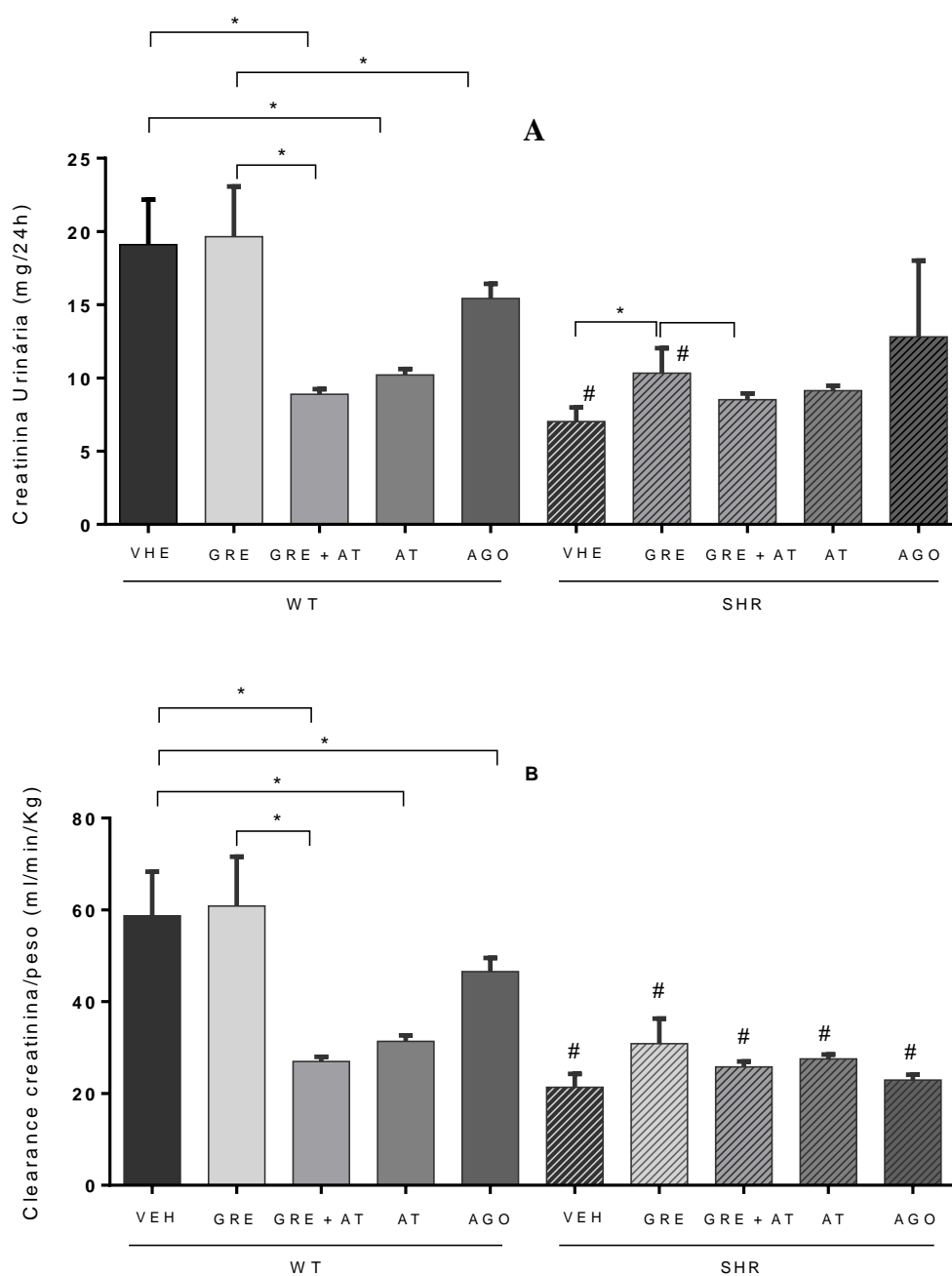
- **Creatinina urinária (mg/dL) (Figura 23B)** – Os níveis de creatinina urinária diferiram entre WT e SHR injetados com veículo (WT:  $182,0 \pm 31,0$  vs. SHR:  $61,2 \pm 8,5$ ;  $p < 0,05$ ). GRE não modificou os níveis de creatinina urinária em WT e SHR quando comparado ao veículo. Quando comparados WT e SHR, os níveis de creatinina urinária foram diferentes após tratamentos com GRE (SHR:  $99,0 \pm 18,0$  vs. WT:  $203,2 \pm 36,4$ ;  $p < 0,05$ ), GRE+AT (SHR:  $78,7 \pm 0,3$  vs. WT:  $74,13 \pm 2,7$ ;  $p < 0,05$ ) e AGO (SHR:  $72,6 \pm 3,4$  vs. WT:  $147,5 \pm 11,2$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 23** – Comparação da concentração de Creatinina plasmática (mg/dL) (A) e comparação da concentração de Creatinina urinária (mg/dL) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

- **Creatinina urinária (mg/24horas) (Figura 24A)** – A creatinina urinária de 24h foi menor nos SHR do que nos WT injetados com veículo (SHR:  $7,0 \pm 0,1$  vs. WT:  $19,1 \pm 3,0$ ;  $p < 0,05$ ). A amplitude da resposta à GRE também foi menor em SHR quando comparado ao mesmo tratamento em WT (GRE:  $10,3 \pm 1,7$  vs. GRE:  $19,5 \pm 3,4$ ;  $p < 0,05$ ). A injeção de GRE aumentou a creatinina urinária de 24h somente em SHR (GRE:  $10,3 \pm 1,7$  vs. VEH:  $7,0 \pm 0,1$ ;  $p < 0,05$ ), o que foi revertido pela injeção concomitante de GRE + AT (GRE:  $10,3 \pm 1,7$  vs. GRE + AT:  $8,25 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, injeção de GRE + AT (GRE+AT:  $8,8 \pm 0,3$  vs. VEH:  $19,1 \pm 3,0$ ;  $p < 0,05$ ) ou de apenas AT (AT:  $10,2 \pm 3,0$  vs. VEH:  $19,1 \pm 3,0$ ;  $p < 0,05$ ) reduziram a creatinina urinária de 24h em WT.

- **Clearance de creatinina/peso (ml/min/Kg) (Figura 24B)** – O clearance de creatinina/peso foi menor em SHR quando comparados com WT injetados com veículo (VEH:  $30,8 \pm 5,4$  vs. VEH:  $58,7 \pm 9,6$ ;  $p < 0,05$ ) respectivamente. A linhagem hipertensa também apresentou valores menores nos confrontos: (GRE:  $21,33 \pm 3,0$  vs. GRE:  $60,83 \pm 10,0$ ;  $p < 0,05$ ); (GRE+AT:  $25,8 \pm 1,2$  vs. GRE+AT:  $27,0 \pm 1,0$ ;  $p < 0,05$ ); (AT:  $27,52 \pm 0,1$  vs. AT:  $31,3 \pm 1,3$ ;  $p < 0,05$ ) e (AGO:  $22,1 \pm 1,0$  vs. AGO:  $46,5 \pm 3,0$ ;  $p < 0,05$ ). A GRE não modificou o clearance de creatinina/peso em WT e SHR. A coadministração de GRE + AT (GRE+AT:  $26,6 \pm 1,0$  vs. VEH:  $58,7 \pm 9,6$ ;  $p < 0,05$ ) e de AT apenas, reduziram o clearance de creatinina/24h somente em WT. A injeção do AGO reduziu o clearance de creatinina/peso de WT (AGO:  $46,5 \pm 3,0$  vs. VEH:  $58,7 \pm 9,6$ ;  $p < 0,05$ ). Os valores para Clearance de creatinina/peso, que refletem o ritmo de filtração glomerular, portanto, diferiram significativamente quando comparados animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) para o mesmo tratamento.



**Figura 24** – Comparação da concentração de Creatinina urinária (mg/24horas) (A) e comparação do clearance de Creatinina/peso (ml/min/Kg) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção subcutânea dos diferentes tratamentos: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina- 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg/Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. As comparações foram realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. \* vs. veículo (mesma linhagem); # vs. WT mesmo tratamento.

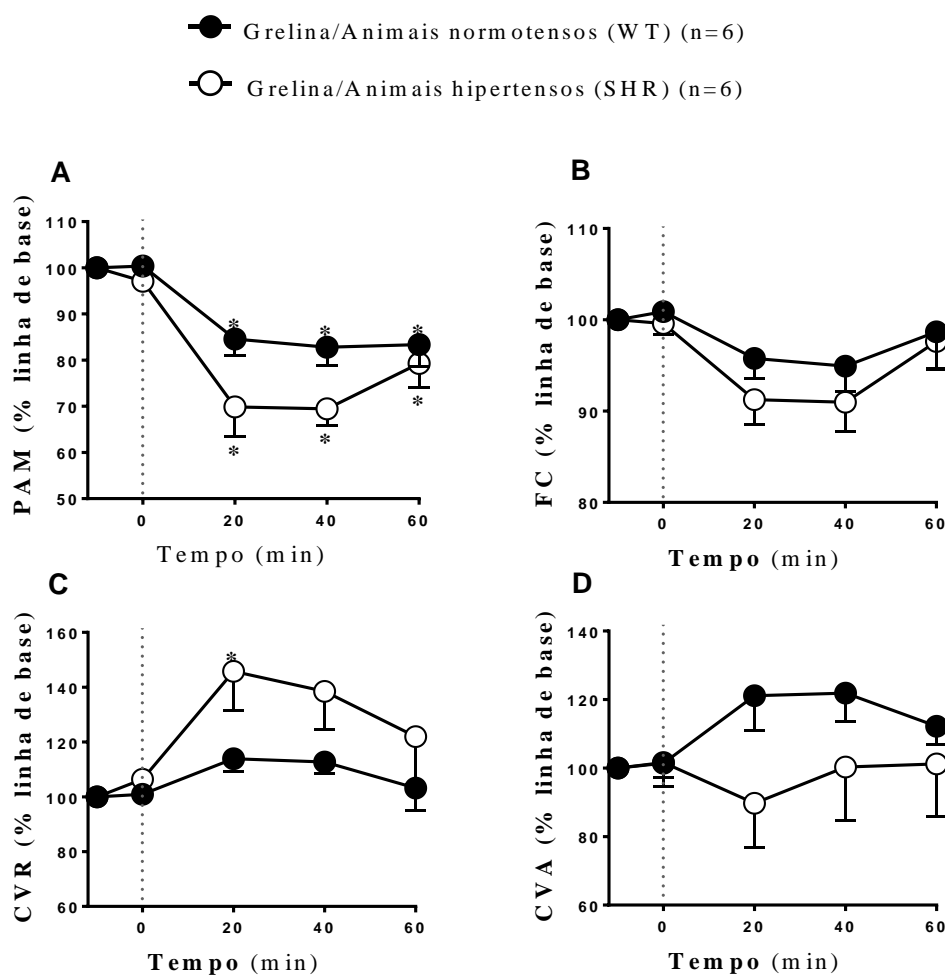
**Sumário com os resultados:** Creatinina plasmática (mg/dL), creatinina urinária (mg/dL), creatinina urinária(mg/24horas) e clearance de creatinina/peso (ml/min/Kg).

**Tabela 5.** Síntese dos resultados das comparações das concentrações da creatinina plasmática e urinária (mg/dl), creatinina (mg/24horas) e clearance de creatinina/ peso dos animais normotensos e hipertensos comparados com veículo WISTAR x VEH (<sup>†</sup>vs. veículo) e SHR x VEH (<sup>†</sup>vs. veículo) respectivamente. WISTAR x SHR (<sup>#</sup>vs. mesmo tratamento) mostra a comparação entre as linhagens. As medidas foram executadas 24h após injeção subcutânea: Veículo - NaCl 0,9% (VEH); Grelina - 10µg/Kg (GRE); Grelina (10µg / Kg) + antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (GRE+AT); Antagonista de GHS-R1a - PF04628935 - 0,4mg/Kg (AT) ou Agonista de GHS-R1a MK0677 - 10µg/Kg (AGO). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. Análise através de Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. <sup>\*</sup>vs. veículo; <sup>#</sup>vs. mesmo tratamento. \* <sup>↑</sup> = Aumento significativo; <sup>\*</sup><sup>↓</sup> = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05.

<b>WISTAR X VEH (<sup>†</sup>vs.veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Creatinina Plasmática (mg/dl)	—	* <sup>↑</sup>	—	* <sup>↑</sup>	
Creatinina Urinária (mg/dl)	—	* <sup>↓</sup>	—	—	
Creatinina Urinária (mg/24horas)	—	* <sup>↓</sup>	* <sup>↓</sup>	—	
Clearance de Creatinina/peso	—	* <sup>↓</sup>	* <sup>↓</sup>	* <sup>↓</sup>	
<b>SHR X VEH (<sup>†</sup>vs.veículo)</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>	
Creatinina Plasmática (mg/dl)	* <sup>↑</sup>	—	—	—	
Creatinina Urinária (mg/dl)	—	—	—	—	
Creatinina Urinária (mg/24horas)	* <sup>↑</sup>	—	—	—	
Clearance de Creatinina/peso	—	—	—	—	
<b>WISTAR X SHR (<sup>#</sup>vs. mesmo tratamento)</b>	<b>VEH</b>	<b>GRE</b>	<b>GRE+AT</b>	<b>AT</b>	<b>AGO</b>
Creatinina Plasmática (mg/dl)	—	—	—	—	—
Creatinina Urinária (mg/dl)	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>	—	# <sup>↓</sup>
Creatinina Urinária (mg/24horas)	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>	—	—	—
Clearance de Creatinina/peso	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>	# <sup>↓</sup>

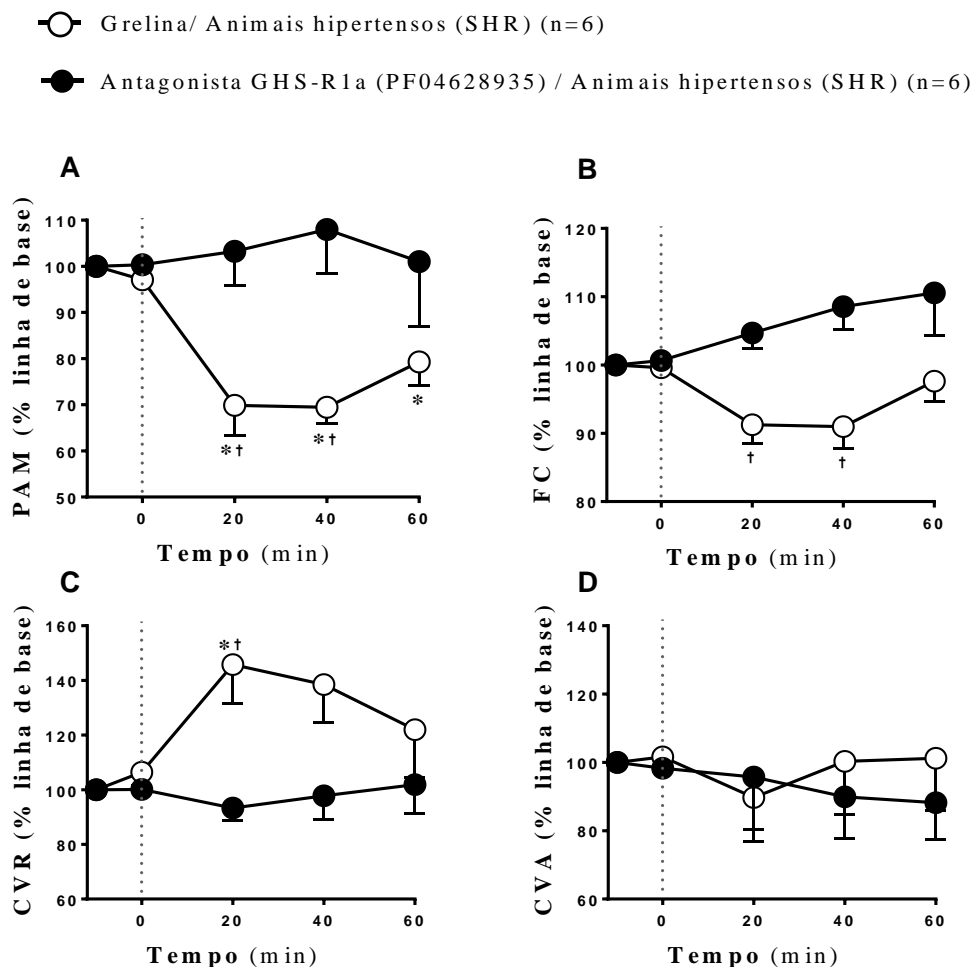
#### 4.5. Investigação dos efeitos da administração aguda de grelina e do papel dos receptores GHS-R1a sobre a hemodinâmica renal

Na primeira série experimental, para investigação dos eventos hemodinâmicos, (Figura 25, A-D), um grupo animais normotensos (WT) e outro de hipertensos (SHR) receberam injeções intravenosas (i.v.) *in bolus* de Grelina (10 µg/Kg) e os parâmetros cardiovasculares (hemodinâmicos) a seguir foram registrados: Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC), Condutância Vascular Renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA). A injeção de Grelina reduziu a PAM em ambas as linhagens (WT:  $-15,4 \pm 3,6\%$  vs. SHR:  $-30,1 \pm 6,5\%$ , 20 min depois da injeção de grelina;  $p < 0,05$ ), sem evocar alterações cronotrópicas cardíacas significativas. A Grelina aumentou a CVR em animais SHR (SHR:  $-45,8 \pm 14,3\%$ , 20 minutos após administração de grelina,  $p < 0,05$  vs. linha de base ou tempo 0), enquanto esse parâmetro não foi alterado em animais normotensos. A CVA, por sua vez, não foi modificada pela injeção de Grelina em ambos os grupos (WT:  $-21,1 \pm 10,1\%$  vs. SHR:  $-10,3 \pm 12,8\%$ , 20 minutos após Grelina).



**Figura 25** – Primeira série experimental para investigação dos eventos hemodinâmicos: Comparação dos efeitos da administração intravenosa *in bolus* de Grelina (10µg/Kg) em animais normotensos (WT, n=6) e hipertensos (SHR, n=6). Foram avaliadas as variações da Pressão Arterial Média (PAM, % linha de base, A); Frequência Cardíaca (FC, % linha de base, B); Condutância Vascular Renal (CVR, % linha de base, C) e Condutância Vascular Aórtica (CVA, % linha de base, D). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. \* Diferente do tempo 0; p<0,05. A linha tracejada representa o momento da injeção de Grelina para cada grupo.

Na segunda série experimental (Figura 25, A-D), o antagonista dos receptores GHS-R1a (PF04628935 – 0,4mg/Kg) foi injetado 20 minutos antes da Grelina para investigar a contribuição desses receptores para as respostas à injeção de grelina em animais hipertensos (SHR). Na presença do antagonista de GHS-R1a (PF04628935), a injeção de Grelina não foi capaz de modifica PAM, CVR e CVA ( $p < 0,05$  vs. Grelina). Portanto, o antagonista de GHS-R1a reverteu as respostas na PAM e CVR provocadas pela grelina em SHR. Interessantemente, a FC foi diferente entre os SHR injetados com Grelina e àqueles injetados com PF04628935 antes da Grelina (GRE vs. AT+GRE;  $p < 0,05$ ).



**Figura 26** – Segunda série experimental para investigação dos eventos hemodinâmicos: Comparação dos efeitos da administração intravenosa, *in bolus*, de Grelina (10 $\mu$ g/Kg) e a administração do Antagonista GHS-R1a em animais hipertensos (SHR, n=6). Foram avaliadas as variações da Pressão Arterial Média (PAM, % linha de base, A); Frequência Cardíaca (FC, % linha de base, B); Condutância Vascular Renal (CVR, % linha de base, C) e Condutância Vascular Aórtica (CVA, % linha de base, D). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média. \*Diferente do tempo 0; †Diferente do controle;  $p < 0,05$ . A linha tracejada representa o momento da injeção de Grelina e do Antagonista GHS-R1a (PF04628935).

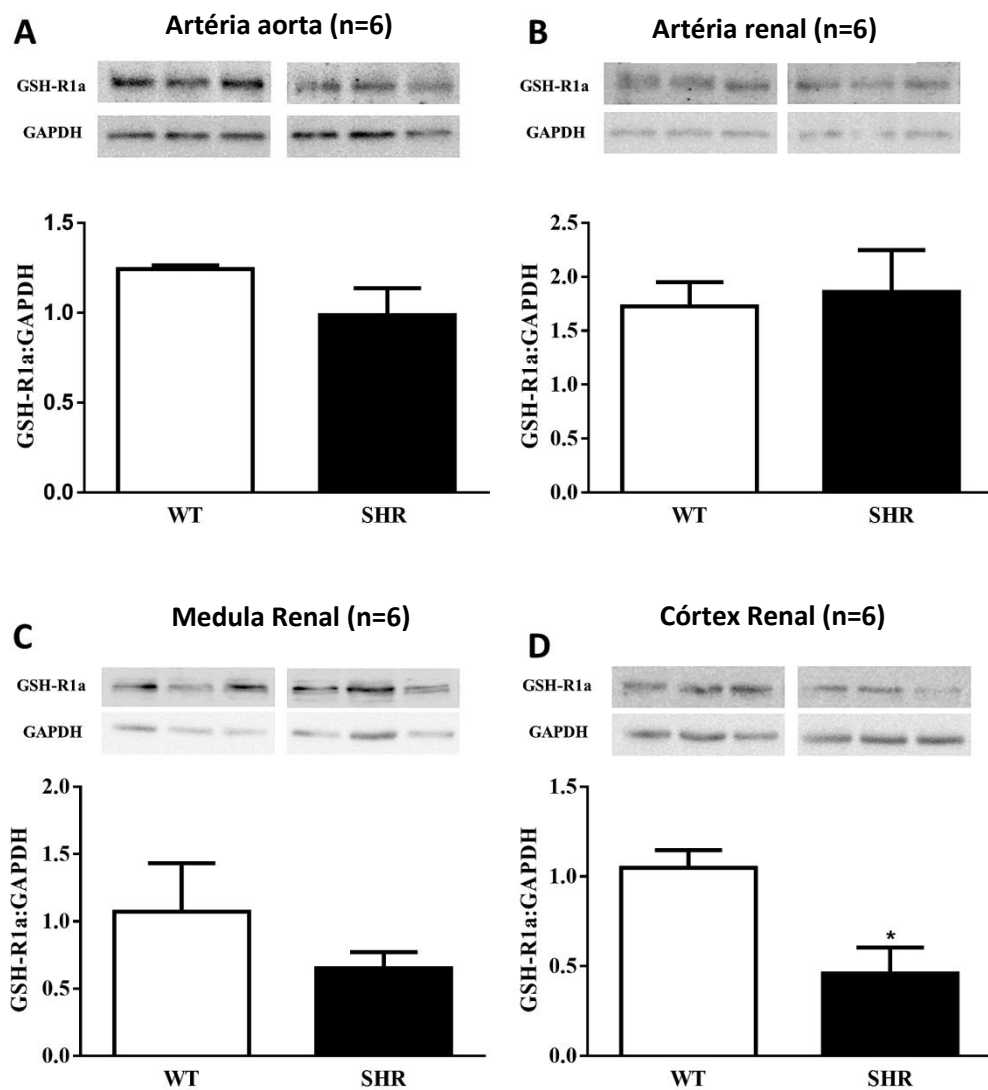
**Sumário com os resultados:** Pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), condutância vascular renal e condutância vascular aórtica.

**Tabela 6.** Síntese dos resultados apresentados em relação à resposta hemodinâmica dos animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) após a injeção *in bolus* de Grelina a 10 µg/Kg (WISTAR \*vs. SHR) (A). Para avaliação da modulação dos receptores GHS-R1a, também estão apresentados os resultados, em outra série experimental, com injeção de Grelina a 10 µg/Kg 20 e do antagonista 0,4mg/Kg (AT/PF04628935) (B). Os parâmetros vasculares investigados foram PAM (pressão arterial média), FC (frequência cardíaca), CVR (condutância vascular renal) e CVA (condutância vascular aórtica). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. \* ↑ = Aumento significativo; \* ↓ = Diminuição significativa; - sem alteração significativa; p < 0,05.

<b>A - HEMODINÂMICA PARA GRELINA (%)</b>	<b>WISTAR (WT) *vs SHR (Média ± Erro Padrão da Média)</b>	<b>SHR</b>
Pressão Arterial Média (PAM)	(90,2 ± 4,08 vs 83,1 ± 6,5)	*↓
Frequência Cardíaca (FC)	(98 ± 1,16 vs 95,9 ± 2,0)	-
Condutância Vascular Renal (CVR)	(106,1 ± 2,98 vs 122,5 ± 8,84)	*↑
Condutância Vascular Aórtica (CVA)	(111,3 ± 4,6 vs 98,6 ± 2,23)	-
<b>B – HEMODINÂMICA (%): GRELINA + PF04628935</b>	<b>SHR (Grelina) *vs SHR (AT/PF04628935) (Média ± Erro Padrão da Média)</b>	<b>SHR (AT/PF04628935)</b>
Pressão Arterial Média (PAM)	(83,14 ± 6,5 vs 102,5 ± 1,5)	*↑
Frequência Cardíaca (FC)	(96,0 ± 2,0 vs 104,9 ± 2,1)	-
Condutância Vascular Renal (CVR)	(122,5 ± 8,8 vs 98,6 ± 1,5)	*↓
Condutância Vascular Aórtica (AVC)	(98,5 ± 2,23 vs 94,4 ± 2,3)	-

#### 4.6. Investigação da expressão dos receptores de Grelina, GHS-R1a, na artéria aorta, artéria renal, medula renal e córtex renal

Nessa série experimental, comparamos a expressão dos receptores GHS-R1a em artéria aorta, artéria renal, medula e córtex renais entre animais normotensos (WT) e animais hipertensos (SHR) por *Western Blot* (Figura 27). Não houve diferenças na expressão de GHS-R1a na artéria aorta (A), artéria renal (B) e medula renal (C) quando comparados WT e SHR. Todavia, a expressão dos receptores GHS-R1a foi significativamente menor no córtex renal de SHR em comparação aos níveis encontrados em WT (D) (\* $p < 0,05$  vs. WT).



**Figura 27** - Comparação da expressão dos receptores GHS-R1a na artéria aorta (A), artéria renal (B), medula (C) e córtex (D) renal de animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR). Os dados foram expressos como Média  $\pm$  EPM e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$  vs. WT).

### Sumário dos resultados: Expressão dos receptores GHS-R1a.

**Tabela 7.** Síntese da comparação dos resultados apresentados para avaliara expressão dos receptores GHS-R1a para animais normotensos (WT) e animais hipertensos (SHR) por *Western Blot*. Os resultados revelam que não houve diferenças significativas entre animais normotensos (WT) e animais espontaneamente hipertensos (SHR) na maioria das estruturas observadas. A expressão dos receptores GHS-R1a em SHR, porém, apresentou diminuição estatisticamente significativa em relação ao córtex renal comparados aos animais normotensos (WT). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para  $p < 0,05$ . + houve a expressão dos receptores GHS-R1a; para o córtex renal \* $\downarrow$  significa a mesma expressão diminuída.

EXPRESSÃO DOS RECEPTORES GHS-R1a	WISTAR	SHR
Artéria Renal	+	+
Artéria Aórtica	+	+
Medula Renal	+	+
Córtex Renal	+	* $\downarrow$

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: i) A interação grelina-GHS-R1a sugere o provável envolvimento nos mecanismos de controle da pressão arterial, já que a amplitude de respostas aos agonistas e ao antagonista de GHS-R1a diferiram em vários parâmetros de função renal entre WT e SHR; ii) A mesma interação revelou respostas diferenciais quanto a influência hemodinâmica na pressão arterial média e condutância vascular renal entre WT e SHR; iii) A expressão dos receptores GHS-R1a no córtex renal apresentou diferença entre WT e SHR.

Os dados acerca das funções da grelina vêm crescendo desde sua descoberta por Kojima e colaboradores (1, 13, 145). Se no início, o entusiasmo dos pesquisadores estava em torno do controle da homeostase energética e ingesta de alimentos (5, 8, 28, 134, 146-148); os desdobramentos atuais revelam efeitos multissistêmicos e o caráter pleiotrópico desse hormônio e dos seus receptores, o que tem reforçado a ideia de seu papel na fisiologia integrativa (11, 34, 37, 149-151).

A maior parte dos estudos buscou caracterizar os efeitos centrais e periféricos da grelina (152-154). Os resultados obtidos neste trabalho para WT e SHR reforçam os achados clássicos quanto aos efeitos metabólicos (155). A ativação dos receptores GHS-R1a está envolvida nas respostas hemodinâmicas que podem controlar a pressão arterial, além de estar ligada a moderação do apetite (38, 57). O apetite por sal típico característico da hipertensão (156), pode justificar, em parte o efeito encontrado. Já em 1988 Yongue e Myers estudaram SHR e concluíram que o apetite por sal (comida) estava aumentado nesta linhagem independente do quadro hipertensivo (157). No mesmo ano, Di Nicolantonio e Silvapulle reportaram uma correlação direta entre mortalidade e apetite por sódio em animais hipertensos (158-159). Estudo feito por Lendigham (1990) mostrou maior ingestão de sódio e de retenção desse eletrólito em SHR (105). De fato, nossos dados demonstram que o antagonista de GHS-R1a reduziu a ingesta de ração, e que a amplitude desse efeito foi menor em SHR, indicando que o quadro hipertensivo influencia na ingesta de ração. Ademais, o quadro hipertensivo parece modificar a contribuição/sensibilidade dos receptores GHS-R1a, revelando como essa situação pode afetar ou ser afetada pela sinalização grelina-GHSR1a (19, 69, 160-161).

Gong *et al.*, (2017) avaliaram a ação da grelina em regiões do hipotálamo lateral e região dorsal do vago sugerindo que pode atuar na regulação da secreção

gástrica e sua motilidade (162). Takemi *et al.*, (2017) mostraram a ação integrada da motilina e da grelina sobre o peristaltismo e quando administraram o antagonista de grelina (D-Lys3GHRP6) houve reversão dessa resposta (163). No nosso trabalho, o uso de GRE+AT reverteu o aumento na quantidade de fezes provocado pela GRE ou por AGO em WT quanto em SHR. Essas respostas reforçam o papel da grelina sobre o sistema gastro-intestinal também já pesquisados por Mondal *et al.*,(2012) e Kuroda *et al.*,(2015) (164-165).

A ingestão de água não diferiu entre WT e SHR em todos os tratamentos, com exceção do AGO que provocou menor efeito em SHR. Relatos anteriores mostraram que a ativação de GHS-R1a tem efeito antidipsogênico (166). Outros estudos revelam os efeitos da grelina diminuindo a ingestão de água e volemia em ratos (98). A grelina mostrou efeitos antidipsogênico sem animais injetados centralmente angiotensina II, um modelo de indução de busca e ingestão de fluidos (96). Tal efeito parece ser independente do quadro hipertensivo (157), o que contrapõe nossos achados no grupo SHR injetados com AGO. Sabe-se que SHR tem metabolismo noradrenérgico e angiotensinérgico alterados, o que pode interferir nas respostas integrativas de outras moléculas com o receptor GHS-R1a (69, 167-168). De fato, em estudo recente, demonstramos que a ativação de GHS-R1a com grelina modifica a reatividade cardíaca ao estresse, altera o tônus autonômico simpático e aumenta a sensibilidade beta-adrenérgica (88).

A modulação dos volumes e tonicidade urinários, plasmáticos e dos líquidos corporais é decisiva para a manutenção da pressão arterial (56, 169), o que é determinado também por osmorreceptores centrais periventriculares. Neste ponto, poderia se especular a relação do eixo grelina-GHS-R1a na modulação de centros hipotalâmicos que controlam a fome e a sede (128, 162, 170). A relação entre ingestão de água e comida poderia ser encarada como um “equilíbrio” quando ofertadas *ad libitum* (171-173). Esse equilíbrio está ligado à composição corporal tanto em massa quanto em volume, o que pode refletir diretamente no ajuste da pressão arterial (71, 147). A diferença de resposta ao AGO em SHR permite sugerir que algum fator ligado a hipertensão de origem neurogênica pode alterar o comportamento dos receptores GHS-R1a. Esse padrão diferente de respostas também foi proposto nos trabalhos de BROGLIO, 2006; SUN, 2007; MAO, 2016 (44, 56, 174). Por outro lado, a ativação de GHS-R1a com GRE ou AGO provocou respostas equipotentes de redução da diurese entre linhagens. Em suma, os

volumes urinários integram as respostas fisiológicas que possivelmente sincronizam a ingestão de ração e água (162, 175). Isto, sabidamente, está vinculado a homeostasia pressórica (39, 76). A pressão arterial é um parâmetro intimamente ligado ao débito cardíaco e à resistência periférica (95) podendo ser ajustada por mecanismos centrais e periféricos (65, 176). Mecanismos autonômicos e endócrinos são alguns dos vários elementos que influenciam a função renal (177). Portanto, o volume urinário pode refletir respostas fisiológicas integrativas que possivelmente resultam da sincronização da ingestão de alimentos e água (162).

Os efeitos integrativos que resultam no volume e composição da urina estão correlacionados com a homeostase hemodinâmica (178). Neste estudo, a injeção de grelina provocou diurese semelhante em animais normotensos e hipertensos, enquanto o antagonismo do GHS-R1a aumentou essas respostas. Essa é uma forte evidência do envolvimento da interação grelina-GHS-R1a no controle da função renal, que também foi assunto de discussão prévia (58). As hipóteses levantadas para esse comportamento são: i) os componentes renais - reabsorções de líquidos e sódio - envolvidos na hipertensão dependem do GHS-R1a; ii) a grelina age no GHS-R1a e em outros alvos moleculares no rim, de modo que seus efeitos não revelam discrepâncias entre ratos normotensos e hipertensos (136, 177). Portanto, um efeito direto desencadeado a partir do GHS-R1a no nível microvascular pode ser um dos determinantes dos efeitos renais (60, 136).

Enquanto a osmolaridade plasmática não foi alterada por nenhum tratamento, a osmolaridade urinária, por sua vez, foi diminuída em ratos normotensos injetados com o AGO do GHS-R1a. O mesmo foi observado em animais hipertensos injetados com o antagonista (AT) do GHS-R1a. Muccioli e colaboradores propõem criticamente a não linearidade das respostas ligadas a interação Grelina-GHS-R1a (21). Muitas investigações devem avançar no sentido de demonstrar a versatilidade dos receptores GHS-R1a para outros ligantes e até mesmo a possibilidade da Grelina atuar em outros receptores (21, 131). A osmolaridade urinária foi maior em SHR. Vários autores propõem que SHR precisam de uma pressão sanguínea maior para excretar sal e água, neste caso, esse aumento poderia contar com a contribuição dos efeitos antidipsogênicos da Grelina, que ao diminuir a ingestão de água poderia reprogramar os mecanismos de ação da vasopressina e aldosterona, além da interação com angiotensina (68, 107, 109, 113).

Muitos hormônios são responsáveis pela fisiopatologia da hipertensão, como os que compõem os sistemas adrenérgicos (179) e renina-angiotensina (115, 180). Nesse sentido, não pode ser negligenciado que outras moléculas possam interagir com o GHS-R1a, provocando assim respostas diferenciadas encontradas no presente estudo. Um exemplo é o papel dos receptores beta-adrenérgicos na potenciação das alterações transitórias do cálcio cardíaco produzidas pela grelina que reportamos recentemente (88).

O clearance osmolar reflete a capacidade renal de ajustar a tonicidade do fluido e o balanço hídrico. Esta função está estreitamente correlacionada com o *feedback* entre os túbulos renais e o hormônio vasopressina e pode envolver a grelina (36). Estudos demonstraram que a grelina estimula a liberação de vasopressina em ratos (181). Em nosso estudo, o antagonismo do GHS-R1a aumentou o clearance osmolar em animais normotensos, o que não foi observado em SHR. A administração de AT promoveu aumento da ingestão de água em WT e SHR. Considerando o clearance e a osmolaridade como meios de ajustar volume e concentração de eletrólitos, a grelina e os receptores GHS-R1a poderiam estar envolvidos na manutenção da função tubular (94).

Nos animais hipertensos, a injeção de grelina provocou aumento do clearance osmolar, cujo efeito foi revertido pelo concomitante antagonismo de receptores GHS-R1a (GRE+AT), e diminuição quando usado apenas AT. Os dados obtidos fornecem evidências substanciais de que na hipertensão há uma grande suscetibilidade a mudanças na regulação da função tubular pelo eixo grelina-GHS-R1a. O clearance osmolar foi aumentado nos animais hipertensos tratados com GRE e AGO, permitindo hipotetizar que na hipertensão, mecanismos adicionais ainda não revelados modificam a função e sensibilidade do sistema grelinérgico e sua participação no controle da função renal nessa condição. É possível que este sistema interaja com sistemas hormonais que controlam a função tubular, como vasopressina (129, 182), angiotensina (85, 92), endotelina, peptídeos natriuréticos e óxido nítrico (183), o que apóia a idéia de que a homeostase resulta de influências multissistêmicas (57, 184). Nossos achados recentes indicam que a ação tubular da grelina e a função/expressão do GHS-R1a seriam alteradas durante a hipertensão primária, o que fornece suporte adicional à hipótese acima.

O clearance da água livre representa a diferença entre o volume total de urina e o clearance osmolar, revelando assim a eficiência dos processos de reabsorção de

água e eletrólitos. De um modo geral, representa a quantidade de água que deveria ser adicionada ou subtraída da urina para que se torne isosmótica com o plasma (36). Em nosso estudo, GRE e AGO causaram aumentos na amplitude do clearance da água em SHR, o que foi revertido pelo antagonismo do GHS-R1a (AT). O clearance de água livre representa a produção de urina hipertônica, que nos animais hipertensos poderia significar uma consequência da necessidade de elevação da pressão para excretar sal e água (Natriurese de Pressão) (106, 185). Os dados sugerem a participação direta e proeminente dos receptores GHS-R1a na função tubular renal durante hipertensão, ou uma possível ação sinérgica com outros mecanismos que controlam a função tubular que estaria alterada nessa condição hipertensiva (85, 183).

Os níveis plasmáticos de sódio  $[Na^+]$  e potássio  $[K^+]$  não apresentaram diferenças significativas entre grupos e linhagens. No entanto, as concentrações desses eletrólitos na urina foram reduzidas em ratos normotensos e hipertensos tratados com a associação da grelina com o antagonista do GHS-R1a, enquanto o agonista do GHS-R1a aumentou a  $[K^+]$  urinário nos animais hipertensos. Quando comparados os animais normotensos e hipertensos, houve diminuição da  $[Na^+]$  urinário em SHR tratados com GRE, o que poderia indicar um aumento na reabsorção tubular deste íon (57, 87, 94). Sabendo que a retenção de  $Na^+$  é um dos fatores determinantes na hipertensão (186), a ativação do GHS-R1a parece fazer parte do arsenal mecanicista recrutado para deflagrar a hipertensão. O efeito antinatriurético da grelina foi relatado por Kemp e colaboradores (38). Também foi observado que a administração de grelina aumenta a reabsorção de sódio em animais normotensos sem alterar a pressão arterial, a taxa de filtração glomerular e a excreção fracional de lítio (38). Alguns autores discutiram o papel do canal de sódio (ENaC) expresso na porção cortical do túbulo coletor através de mecanismos autócrinos e parácrinos (156). O ENaC é influenciado por alguns hormônios como a aldosterona, a vasopressina e a insulina (187) e sua interação com a grelina é uma questão que permanece por ser elucidada.

A creatinina plasmática (CrP) é o principal teste para avaliar a função renal. Embora não seja totalmente sensível em muitas condições clínicas, a CrP pode refletir a taxa de filtração glomerular (188). A concentração de creatinina (Cr) pode variar dependendo da idade, sexo, dieta, peso corporal e diabetes *mellitus*, hipertensão arterial e outros (187). No presente trabalho, a ativação do eixo grelina-

GHS-R1a aumentou a creatinina plasmática em animais hipertensos tratados com GRE e em normotensos tratados com AGO. A atividade de GHS-R1a parece estar envolvida nos mecanismos de filtração glomerular, uma vez que os níveis de CrU podem indicar a função renal não apenas pela creatinina, mas, por inferência, por outras substâncias, incluindo toxinas (189). Isto pode ser somado aos resultados obtidos para a creatinina urinária, que foram menores nos animais hipertensos quando comparados aos normotensos tratados com GRE, GRE+AT e AGO.

Neste estudo, os efeitos sobre o Clearance de creatinina (CICr) diferiram entre WT e SHR, com menores valores em animais hipertensos submetidos a todos os tratamentos. Esses parâmetros também foram estudados previamente durante a investigação do CICr nas alterações metabólicas e no risco de lesões tubulares (36, 190-191). Os menores valores de CICr em animais hipertensos podem sugerir uma menor capacidade desses animais em ajustar a excreção de creatinina, possivelmente devido a alterações na função glomerular e tubular (192). Além disso, as diminuições significativas nos volumes urinários dos animais tratados com GRE e AGO sugerem a participação do eixo grelina-GHS-R1a na formação da urina. Muitos trabalhos propõem alterações na morfofisiologia renal de SHR mesmo em fases mais jovens da vida dessa linhagem (106, 185). A hipertensão reproduz o ciclo vicioso de Klarh na medida em que progride e compromete a função renal que, por sua vez, desregula a pressão arterial (117). A interação grelina e seus receptores poderiam se colocar entre esses eventos. Essa hipótese deve ser mais investigada, uma vez que os resultados nesse trabalho revelam comportamentos diferentes entre normotensos e hipertensos. Uma vez que SHR apresentou menores taxas de filtração glomerular e subexpressão de GHS-R1a no córtex renal, reforça o fato de que as interações multissistêmicas relacionadas com a GHS-R1a após a hipertensão não devam ser descartadas.

Considerando a hemodinâmica na perspectiva da função renal, é possível que a interação grelina-GHS-R1a também possa atuar no controle da vasomotricidade de alguns leitos, inclusive o renal, nas condições de normotensão e hipertensão. Os efeitos vasculares são provavelmente investigados com o objetivo principal de delimitar se essas respostas resultam de efeitos centrais e / ou periféricos, como já citado (71). A aferição dos parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados mostra que a injeção de grelina diminui a pressão arterial média em linhagens normotensas e hipertensas sem alterar a frequência cardíaca. Além disso, GRE

aumenta a condutância vascular renal, mas não modifica a hemodinâmica aórtica. Esses efeitos parecem depender também da atividade do GHS-R1a, uma vez que seu antagonismo reverteu as mudanças na pressão arterial e condutância renal. Estudos anteriores mostraram que a injeção intravenosa de grelina reduz a pressão arterial de coelhos conscientes (63). A injeção intracerebroventricular de grelina produziu mudanças na pressão arterial que foram concomitantes a uma resposta cronotrópica cardíaca (72). Também foi mostrado que a grelina e seus receptores produzem alguns efeitos sobre o controle barorreflexo (73), que é o principal mecanismo de curto prazo que regula as saídas autonômicas para a vasculatura (74).

De fato, a injeção central de grelina diminui a pressão sanguínea e a atividade do nervo simpático renal, sem alterar a frequência cardíaca, como visto no experimento atual, sugerindo que a grelina pode recrutar vias medulares para reduzir a atividade dos neurônios pré-motores simpáticos, enquanto modula simultaneamente influências vagais (63, 73). Experiências em ratos vagotomizados injetados com grelina e capsaicina revelaram que aferentes vagais gástricos representam a principal via indutora da liberação e produção de GH (193-194). Por outro lado, a inibição simpática também pode ocorrer como revelado pela supressão de liberação de norepinefrina no tecido adiposo marrom após infusão central de grelina em ratos (193, 195). Soeki *et al.* observaram que a secreção de grelina no estômago é modulada por sistemas adrenérgicos e colinérgicos (196). A ativação crônica do sistema nervoso autônomo - principalmente seu ramo simpático - está associada à ativação intra-renal dos componentes angiotensinérgicos durante a hipertensão (38, 114). Embora muitos estudos mostrem os efeitos da grelina no endotélio (83), esses mecanismos nem sempre estão confinados a um determinado leito vascular. A vasodilatação, ou mesmo a vasoconstrição, parece basear-se em diversos caminhos (84). Novamente, surge a questão das respostas pleotrópicas dos agentes Grelina-GHS-R1a. Se as respostas integrativas desse hormônio estariam ligadas a outros mediadores vasoativos, além dos efeitos autonômicos (88-89), ainda precisam ser elucidados.

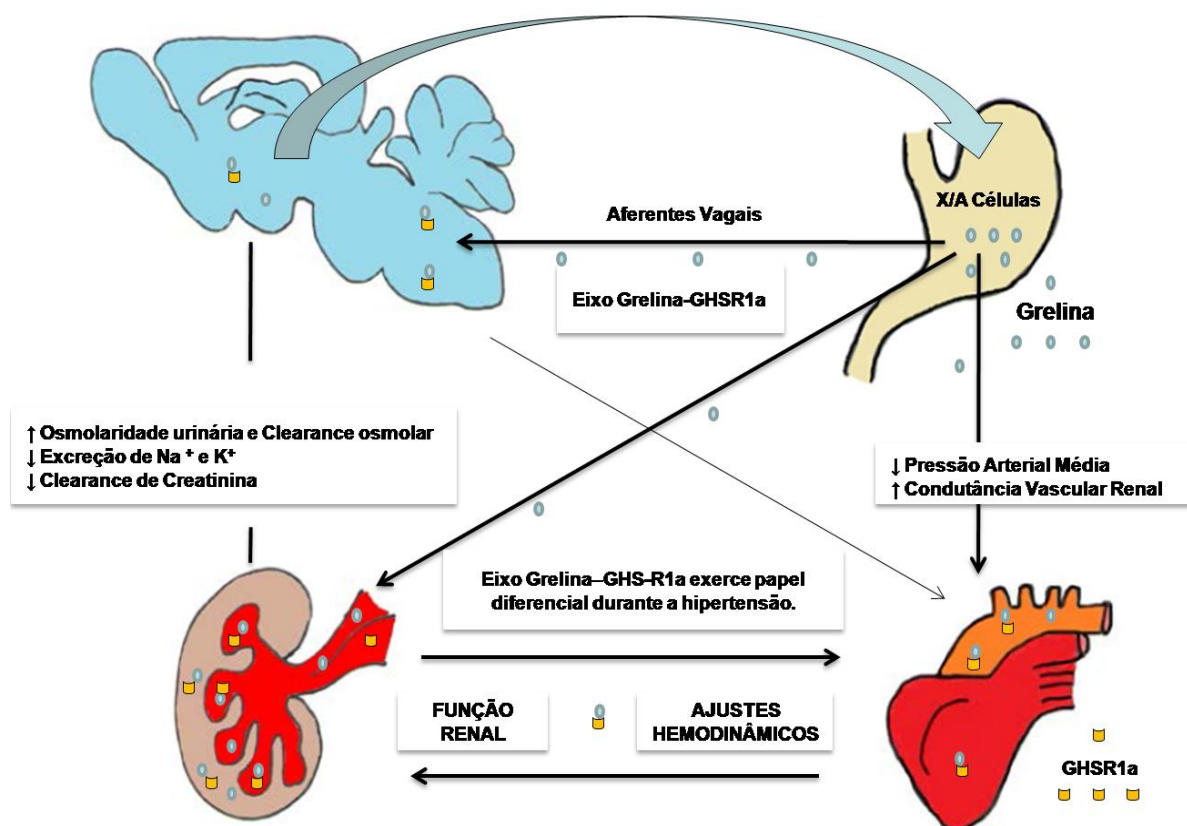
Nossos resultados podem apontar para outros mecanismos, como o controle barorreflexo da pressão arterial, e a contribuição do GHS-R1a em mecanismos de curto prazo de formação de urina durante a normotensão (79). Isto é suportado por

relatos anteriores, que mostraram que a Grelina desempenha um papel na regulação barorreflexa do tônus vasomotor simpático em indivíduos saudáveis (63, 197).

A grelina reduziu a pressão arterial média e aumentou a condutância vascular renal em normotensos e hipertensos, mas a amplitude dessas respostas foi maior em SHR, que foi revertida pelo antagonismo do GHS-R1a. Inevitavelmente, uma conclusão decorrente dessa evidência é que a distribuição e a sensibilidade do GHS-R1a, em alguns leitos vasculares, parecem ser diferenciais durante a hipertensão (67, 87, 94-95). De fato, há uma relação entre as diminuições da condutância vascular renal e hipertensão, com espessamento da cápsula renal (80-81). Enquanto uma ação contrátil da grelina foi observada nas artérias renais isoladas (67, 82), a grelina preservou a vasodilatação nas artérias coronárias isquêmicas de ratos (65).

Para abordar a hipótese de que a expressão de GHS-R1a diferiria nos tecidos vasculares e renais durante a hipertensão, analisamos a expressão de GHS-R1a em amostras de tecido renal e aórtico, córtex e medula dos rins e comparamos os resultados entre as linhagens normotensas e hipertensas. Descobrimos que os níveis de GHS-R1a eram mais baixos no córtex dos rins de SHR. Nos córtices renais se localizam grande parte dos túbulos, arteríolas e néfrons, ou seja, são decisivos nos processos hemodinâmicos e de reabsorção / secreção renais (68). Essa região está de fato envolvida nos ajustes dos níveis de metabólitos (como creatinina e uréia) interferindo no clearance urinário, volume sanguíneo e tonicidade. Embora a expressão de GHS-R1a esteja previamente relatada na medula renal, as avaliações de RT-PCR foram incapazes de detectar mRNA para este receptor na artéria aorta (60).

Portanto, nosso estudo é pioneiro no campo ligando a expressão diminuída do GHS-R1a no córtex renal de ratos hipertensos com possíveis alterações na função renal e hemodinâmica influenciada pela interação grelina-GHS-R1a. As diferenças detectadas entre as linhagens normotensas e hipertensas permitem hipotetizar que o eixo grelina-GHS-R1a pode participar da fisiopatologia da hipertensão. Como essas respostas nem sempre foram semelhantes entre animais normotensos e hipertensos, propomos um controle diferencial da função renal e da hemodinâmica exercido pelo eixo grelina-GHS-R1a como um dos elementos implicados na hipertensão. Os principais pontos que compõem nossos achados e discussões podem ser encontrados na figura a seguir (Figura 28).



**Figura 28** - Principais achados experimentais a partir da investigação dos efeitos da interação grelina-GHS-R1a confirmando as hipóteses iniciais que sugeriam o controle diferencial do eixo em relação à função renal e ajustes hemodinâmicos em animais hipertensos. Fonte: Próprio autor.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que o eixo grelina-GHS-R1a: i) pode contribuir nos ajustes relacionados à função renal de ratos normotensos e hipertensos; ii) pode influenciar proeminentemente a hemodinâmica sistêmica e renal durante a hipertensão; iii) é diferencialmente expresso no córtex renal durante a hipertensão. Como os efeitos da Grelina vão muito além daqueles envolvendo o GHS-R1a (149), concluí-se, portanto, que estudos adicionais devem ser realizados em diferentes modelos experimentais, a fim de desvendar os supostos mecanismos subjacentes às evidências hemodinâmicas aqui relatadas.

## SUPORTE

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG DocFix 04/2014). Elder Sales da Silva was recipient of a PhD fellowship from FAPEG.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: a novel growth-hormone releasing peptide. *Nihon Rinsho* 2001;59(7):1400-7.
2. Vriese, Delporte C. Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;40:1420-4.
3. Sato. Structure, regulation and function of ghrelin. *Biochem* 2012;151(2):119-28.
4. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J*. 2004 Mar;18(3):439-56.
5. Puzstai P. Ghrelin: a new peptide regulating the neurohormonal system, energy homeostasis and glucose metabolism. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:343-52.
6. De Vriese C, Delporte C. Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(8):1420-4.
7. Taylor, Yousang Hwang, Po-Yuan Hsiao, Jef D. Boeke, Cole PA. Ghrelin O-Acyltransferase Assays and Inhibition. *Methods Enzymol*. 2012;514(205-228).
8. Castañeda TR, Tong J DR, Culler M, MH T. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2010;31:44-60.
9. Sakata I, T S. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept*. 2010.
10. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005;85(2):495-522.
11. Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, M P. Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol*. 2005;62(1):1-17.
12. Pires. Reverse pharmacology for developing an anti-malarial phytomedicine. *Drugs and Drug Resistance*. 2014;4:338-46.
13. Kojima. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-60.
14. Kojima M. The discovery of ghrelin-a personal memory. *RegulPept* 2008;10:2-6.
15. Kojima M, K K. Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. *Ann N Y Acad Sci*. 2010:140-8.
16. Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008;46:89-115.

17. Mori K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS* 2000;486:213-6.
18. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005;54:18-24.
19. Lim T. The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocrine Journal* 2011;58(8):707-10.
20. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, DS. W. A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes* 2001. 2001;50.
21. Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, E G. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology*. 2007;86(3):147-64.
22. Inhoff T. Is desacyl ghrelin a modulator of food intake? *Peptides*. 2009;30(5):991.
23. Delhanty P, Neggers J, Lely V. Ghrelin: the differences between acyl- and desacyl ghrelin. *European Journal of Endocrinology*. 2012;167:601-8.
24. Delhanty P, Neggers J, Lely V. Des-acyl ghrelin: a metabolically active peptide. *Endocr Dev*. 2013;25:112-21.
25. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, CI R. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996;273:974-7.
26. Liu B, Garcia EA, M. K. Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acyl transferase (GOAT) genes. *Peptides*. 2011;32(11):2191-207.
27. Hoelz LVB, De Freitas GBL, M TPH, Fernandes TVA, Albuquerque MG, Da Silva JFM, et al. Receptores Acoplados à Proteína G. *Rev Virtual Quim*. 2013;5(5):981-1000.
28. Hosoda H, Kojima M., Kangawa K. Biological, Physiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *J PharmacolSci* 2006;100:398-410.
29. Moreira J, Soares B. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin. *Drug Discovery* 2007;12:7-8.

30. Mondal M. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *RegulPept* 2005;15:55-9.
31. Tokudome T, Kishimoto I, Miyazato M, K. K. Ghrelin and the cardiovascular system. *Front Horm Res.* 2014;43:125-33.
32. Kaiya H. Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2008;149:109-28.
33. Kaiya H. Identification, tissue distribution and functional characterization of the ghrelin receptor in West African lungfish, *Protopterus annectens* *General and Comparative Endocrinology* 2014;209:106-17.
34. Bluet-Pajot MT, Tolle V ZP, Tomasetto C, Grouselle D, J. E. Ghrelin: a striking example of neuroendocrine peptide pleiotropy. *Med Sci (Paris)* 2005;21(8):715-21.
35. Gasco V, Beccuti G, Marotta F, Benso A, Granata R, Broglio F, et al. Endocrine and metabolic actions of ghrelin. *Endocr Dev.* 2010;17:86-95.
36. 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;86(12):5854-9.
37. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, AB G. Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol.* 2004 25(1):27-68.
38. Kemp BA, Howell NL, Gray JT, Keller SR, Nass RM, SH P. Intrarenal ghrelin infusion stimulates distal nephron-dependent sodium reabsorption in normal rats. *Hypertension.* 2011;57(3):633-9.
39. Lilleness BM, WH F. Ghrelin and the Cardiovascular System. *Cardiol Rev.* 2016;24(6):288-97.
40. Chen Y, Ji XW, Zhang AY, Lv JC, Zhang JG, CH. Z. Prognostic value of plasma ghrelin in predicting the outcome of patients with chronic heart failure. *Arch Med Res.* 2014;45(3):263-9.
41. Akboğa M, Taçoy G, Yılmaz Demirtaş C, Türkoğlu S BB. As cardioprotective and angiogenic biomarker, can ghrelin predict coronary collateral development and severity of coronary atherosclerosis? *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2017;45(4):316-23.
42. Srinivasan M, Meadows ML, L M. Assessment of Salivary Adipokines Resistin, Visfatin, and Ghrelin as Type 2 Diabetes Mellitus Biomarkers. *Biochem Res Int.* 2018.
43. Gronberg M, Ahlin C, Naeser Y, Janson ET, Holmberg L, Fjallskog ML. Ghrelin is a prognostic marker and a potential therapeutic target in breast cancer. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176059.

44. Broglio F, Prodam F, Riganti F, Muccioli G, E G. Ghrelin: from somatotrope secretion to new perspectives in the regulation of peripheral metabolic functions. *Front Horm Res.* 2006;35:102-14.
45. Sun. Ghrelin attenuates renal fibrosis and inflammation of obstructive nephropathy. *J Urol.* 2014.
46. Castro A, Pena P, Cordido L, F. Ghrelin in obesity, physiological and pharmacological considerations. . *Mini Rev Med Chem.* 2013;13(4):541-52.
47. Heppner K. Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors. *Diabetes* 2014;63(1):122-31.
48. Hajjar I, Kotchen J.M, J.A. K. Hypertension: Trends in prevalence, incidence and control. . *Annu Rev Public Heath.* 2006;27:465-90
49. Nunes GLS. Measurement of kidney function in patient with hypertension. *Hipertens vol.* 2007;14(3):162-6.
50. Carretero O.A., Oparil S. Essencial hypertension. Part I: Definition and etiology. . *Circulation.* 2000;101(3):329-25.
51. Sanjuliani AF. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. *Revista da SOCERJ* 2002;1.
52. Guyton AC, Coleman TG, AV Jr, Scheel KW, Manning RD Jr, Jr NR. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med.* 1972;52(5):584-94.
53. Chobanian A. Hypertension in 2017-What Is the Right Target? . *JAMA.* 2017;317(6):579-80.
54. Casare FAM. Efeito da interação da angiotensina II e o receptor ATI ou endotelina 3 e os receptores ETA e ETB na função e na morfologia renal de ratos. . *USP.* 2015.
55. Harrap SB, AE. D. Renal haemodynamics and total body sodium in immature spontaneously hypertensive and Wistar-Kyotorats. *J Hypertens Suppl.* 1986;4(3):249-52.
56. Mao, Tokudome T , I K. Ghrelin and Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18(2):15.
57. Aoki. Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. *Endocrine Journal.* 2013;60(5):571-81.
58. Yabuki A, Mizukami K, Tokunaga S, O Y. Change in intrarenal Ghrelin expression in immune complex-mediated glomerular disease in dogs. *J Vet Med Sci.* 2016 78(1):109-12.

59. Venables G , Hunne B BR, Cho HJ, Brock JA, JB F. Ghrelin receptors are expressed by distal tubules of the mouse kidney. *Cell Tissue Res.* 2011 346(1):135-9.
60. Callaghan B, Hunne B, Hirayama H, Sartor DM, Nguyen TV, Abogadie FC, et al. Sites of action of ghrelin receptor ligands in cardiovascular control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(8):1011-21.
61. DiBona GF , M. E. Translational medicine: the antihypertensive effect of renal denervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(2):245-53.
62. Kalaitzidis RG , Karasavvidou D, KC. S. Renal sympathetic denervation and renal physiology. *Curr Clin Pharmacol.* 2013;8(3):189-96.
63. Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K, I A. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension.* 2002 40(5):694-9.
64. Granata R, Isgaard J, Alloatti L, E. G. Cardiovascular actions of the peptides derived from theghrelin and growth hormone releasing hormone. *Exp Biol Med* 2011;236(5):505-14.
65. Pearson JT, Collie N, Lamberts RR, Inagaki T, M Y, Umetani K, et al. Ghrelin Preserves Ischemia-Induced Vasodilation of Male Rat Coronary Vessels Following  $\beta$ -Adrenergic Receptor Blockade. *Endocrinology.* 2018;159(4):1763-73.
66. Boshra V, AM A. Effects of peripheral and central applied ghrelin on stressoxidative stress induced by the renin angiotensin system in aof renovascular hypertension in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2017;28(4):347-54.
67. Dimitrova DZ, Mihov DN, Wang R, Hristov KL, Rizov LI, Bolton TB, et al. Contractile effect of ghrelin on isolated guinea-pig renal arteries. *Vascul Pharmacol.* 2007;47(1).
68. Ahmad F, Ahmeda MA. Factors regulating the renal circulation in spontaneously hypertensive rats. . *Saudi Journal Biological Science* 2015;23:441-51.
69. Kemp BA, Howell NL, Gildea JJ, Keller SR, SH P. Intrarenal ghrelin receptors regulate ENaC-dependent sodium reabsorption by a cAMP-dependent pathway. *Kidney Int.* 2013;84(3):501-8.
70. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, J.J B. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *Am Coll Cardiol.* 2009;54(19):1747-62.
71. ANDREWS. The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *TREND NEUROSCI.* 2011;34(1):31-40.

72. Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, MI I. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension* 2004;43(5):977-82.
73. Huda MS, Mani H, Dovey T, Halford JC, Boyland E, Daousi C, et al. Ghrelin inhibits autonomic function in healthy controls, but has no effect on obese and vagotomized subjects. *Clin Endocrinol* 2010;73(3):678-85.
74. Guyenet P. The sympathetic control of blood pressure. . *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(5):335-46.
75. Isgaard J. Ghrelin and the cardiovascular system. *Endocr Dev* 2013;25:83-90.
76. Viridis, Lerman LO, Regoli F, Ghiadoni G, Lerman Um, S. T. Ghrelin: Gastric Hormone with Properties Cardiovascular. *A Curr Pharm* 2016;22(1):52-8.
77. Thesaurus M, Schinzari F, Rovella V, Di Daniele N, Lauro D, Mores N, et al. Ghrelin restores the balance of endothelin 1 / nitric oxide in patients with metabolic syndrome related to obesity. *Hypertension.* 2009;54(5):995-1000.
78. Zhang CJ, Bidlingmaier H, Altaye H, LC Page, D'Alessio D, Tschöp MH, et al. Acute administration of acyl but not desacylglycine decreases the blood pressure in healthy humans. *J Eur J Endocrinol.* 2017;176(2):123-32.
79. Harris LE, Morgan DG, N B. Growth hormone secretagogue receptor deficiency in mice protects against obesity-induced hypertension. *Physiol Rep.* 2014;2(3):00240.
80. Takata M, Denton KM, WP. A. Renal and systemic vascular conductances in renal wrap hypertension in rabbits. *J Hypertens.* 1988;6(9):19-22.
81. Wright CE, Angus JA, PI K. Structural factors increase blood pressure through the interaction of resistance vessel geometry with neurohumoral and local factors: estimates in rabbits with renal cellophane-wrap hypertension with intact effectors and during neurohumoral blockade. *j hypertens.* 2002;20(3):471-83.
82. Sax B, Nadasy GL, Turi K, Hirschberg K, Furjesz D, Nagy A, et al. Coronary vasoconstrictor effect of ghrelin is not mediated by growth hormone secretagogue receptor 1a type in dogs. *Peptides.* 2011 32(2):362-7.
83. Wiley KE, AP D. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol.* 2002;136(8):1146-52.
84. Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y, Imazu M, Yamamoto H, Shokawa T, et al. Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 310(3):830-5.

85. Deng B , Fang L, Chen X, Chen M, X. X, Zhong, et al. Effect of ghrelin on angiotensin II induced human umbilicus vein endothelial cell oxidative stress and endothelial cell injury. *Ban.* 2010 35(10):1037-47.
86. Gálfi M, Radács M, Molnár Z, Budai I, Tóth G, Pósa A, et al. Ghrelin-Induced Enhancement of Vasopressin and Oxytocin Secretion in Rat Neurohypophyseal Cell Cultures. *J Mol Neurosci.* 2016;60(4):525-30.
87. Callaghan B, Kosari S, Pustovit RV, Sartor DM, Ferens D, Ban K, et al. Hypotensive effects of ghrelin receptor agonists mediated through a novel receptor. *Br J Pharmacol.* 2014;171(5):1275-86.
88. Camargo-Silva G, Turones LC, da Cruz KR, Gomes KP, MM M, A N, et al. Ghrelin potentiates cardiac reactivity to stress by modulating sympathetic control and beta-adrenergic response. *Life Sci.* 2018;196:84-92.
89. Shirai M, Joe N, Tsuchimochi H, Sonobe T, DO S. Ghrelin Supresses Sympathetic Hyperexcitation in Acute Heart Failure in Male Rats: Assessing Centrally and Peripherally Mediated Pathways. *Endocrinology.* 2015;156(9):3309-16.
90. Sayuri. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2011;26(6).
91. Silverthorn, Dee Unglaub. *Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada.* Artmed, . 2010;5.
92. Daniels D. *Neuroscience. Diverse Roles of Angiotensin receptor intracellular signaling pathways in the control of water and salt intake.* *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2014.
93. Kemp BA, Howell NL, SH. P. Intrarenal ghrelin receptor inhibition ameliorates angiotensin II-dependent hypertension in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018:1058-66.
94. Kemp. Intrarenal ghrelin receptor antagonism prevents high-fat diet-induced hypertension in male rats. *Endocrinology.* 2014;155(7):2658-66.
95. Tokudome T. Ghrelin and the heart. *Peptides.* 2018;18.
96. Rossi. Ghrelin inhibits angiotensin II-induced migration of human aortic endothelial cells. 2007;192(2):291-7.
97. Fujimura K, Wakino S, Minakuchi H, Hasegawa K, K H. Ghrelin protects against renal damages induced by angiotensin-II via an antioxidative stress mechanism in mice. *PLoS One.* 2014;18(4):943.

98. Hashimoto H, Otsubo H, Fujihara H, H S. Centrally administered ghrelin potently inhibits water intake induced by angiotensin II and hypovolemia in rats. *J Physiol Sci.* 2010;60(1):19-25.
99. Louis WJ , LG.J H. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. *Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16:1-5.
100. Kopf D, Waldherr R, R. R. Source of kidney determines blood pressure in young renal transplanted rats. *Am J Physiol.* 1993;265:104-11.
101. FAZAN et al. SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS AND PERIPHERAL NEUROPATHIES. Ribeirão Preto. 2006;39:39-50.
102. Pravenec. Recent Progress in the Genetics of Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol* 2014;63(1):1-8.
103. Arendshorst WJ, WH B. Renal tubular reabsorption in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1979;237(1):38-47.
104. DiBona GF, LL R. Mechanism of exaggerated diuresis in spontaneously hypertensive rats. . *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1978;235(5):409-16.
105. Ledingham JM, Simpson FO, M H. Salt appetite, body sodium, handling of a NaCl load, renin, and aldosterone in genetically and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16:7:S6-8.
106. Granger JP , Alexander BT, M L. Mechanisms of pressure natriuresis. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4(2):152-9.
107. DiBona G. Neural regulation of renal tubular sodium reabsorption and rennin secretion: integrative aspects. *Suppl.* 1987;9:151-65.
108. Berecek KH, Rascher W, F. G. Vascular reactivity in the pathogenesis of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1979;57(5):51-3.
109. Arendshorst WJ , Chatziantoniou C, FH. D. Role of angiotensin in the renal vasoconstriction observed during the development of genetic hypertension. *Kidney Int Suppl.* 1990;30:92-6.
110. Poker C. Changes in arterial smooth muscle contractility, contractile proteins, and arterial wall structure in spontaneous hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;207(2):148-74.
111. Wei S, Zhang J, Yang L, Chang Y, Guo F, L J. Effect of adrenomedullin on renal arteriole remodeling in spontaneous hypertensive rats. 2014;34(8):1140-4.

112. Roman RJ, ML K. Renal cortical and papillary blood flow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1988;11(6):657-63.
113. Fink GD, MJ. B. Renal vascular resistance and reactivity in the spontaneously hypertensive rat. . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1979;237(2):128-32.
114. Esler M, Lambert E, Schlach M. Point:Counterpoint: The dominant contributor to systemic hypertension: chronic activation of the sympathetic nervous system vs. activation of the intrarenal renin-angiotensin system. *J Appl Physiol*. 2010;109.
115. Navar L. Counterpoint: Activation of the intrarenal renin-angiotensin system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol* 2010;1998-2000.
116. Carlström M, Wilcox CS, WJ A. Renal autoregulation in health and disease. . *Physiol Rev* 2015;95(2):405-511.
117. Klahr S. The kidney in hypertension--villain and victim. *N Engl J Med*. 1989;320(11):731-3.
118. Pontes RB , Girardi AC, Nishi EE, Campos RR, Bergamaschi. Crosstalk between the renal sympathetic nerve and intrarenal angiotensin II modulates proximal tubular sodium reabsorption. *CTExp Physiol* 2015;100(5):502-6.
119. Messerli FH, Williams B, E. R. Essential hypertension. *Lancet*. 2007;18:591-603.
120. Saxena T , Ali AO , M S. Pathophysiology of essential hypertension: an update. *Expert Rev Cardiovasc* 2018;16(12):879-87.
121. VAN Kleef ME, W S. Hypertension: Overly important but under-controlled. *Eur J Prev Cardiol*. 2017;24(3):36-43.
122. Nagaya N, K. K. Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure. *Drugs*. 2006;66(4):439-48.
123. Cowley AW, Roman RJ, Fenoy FJ. Effect of renal medullary circulation on arterial pressure. *J Hypertens Suppl*. 1992;10(187-93).
124. Tigerstedt R., P B. Kidney and circulation *Arco Physiol*. 1898;8:223-71.
125. Goldblatt H., Lynch J., Hanzal RF, WW S. Studies on experimental hypertension I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure through renal ischemia *J Exp Med*. 1934;59:347-79.
126. Müller. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015;21(4):437-60.
127. Delporte C. Structure and Physiological Actions of Ghrelin. *Coporation Scientifica*. 2013;2013:25.

128. Wang Q, Tang W, Rao WS, Song X, Shan CX, W Z. Changes of Ghrelin/GOAT axis and mTOR pathway in the hypothalamus after sleeve gastrectomy in obese type-2 diabetes rats. *World J Gastroenterol.* 2017;14(23):6231-41.
129. Kageyama H , Takenoya F, Shiba K, S S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides.* 2010;44(2):133-8.
130. Clarke I. Hypothalamus as an endocrine organ. . *Compro Physiol.* 2015;5(1):217-53.
131. Edwards A, Abizaid A. Clarifying the Ghrelin System's Ability to Regulate Feeding Behaviours Despite Enigmatic Spatial Separation of the GHSR and Its Endogenous Ligand. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).
132. Guan JL, Wang QP, Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Matsuoka T, et al. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides.* 2003;24(12):1921-8.
133. Ferrini F, Salio C, Lossi L, A M. Ghrelin in central neurons. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):37-49.
134. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001;11:6817.
135. Heppner KM, TongJ. The ghrelin system: multipleplayers and multiple actions. *Eur J Endocrinol.* 2014.
136. Poher AL, Tschöp MH, TD M. Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides.* 2018;100:236-42.
137. Cummings DE, Foster-Schubert KE, J. O. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets.* 2005;6(2):153-9.
138. Chanoine JP, K DW, P W. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor in growth and development. *Int J Obes (Lond).* 2009;33:48-52.
139. Soeki. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. 2008;294(1):426-32.
140. Berthold HK, Giannakidou E, Krone W, Trégouët DA, I G-B. Influence of ghrelin gene polymorphisms on hypertension and atherosclerotic disease. *Hypertens Res.* 2010;33(2):155-60.
141. Giles A. Guidelines for the use of animals in biomedical research. *Thromb Haemost* 1987;58(4):1078-84.
142. Silva CC. Receptor MAS contribui para o desenvolvimento do remodelamento cardíaco induzido pela gestação. *UFG.* 2016:57.

143. Welch. Validation of miniature ultrasonic transit-time flow probes for measurement of renal blood flow in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1995;268:175-8.
144. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
145. Bowers C. History to the discovery of ghrelin. *Methods Enzymol.* 2012;89(6):514.
146. Gil-Campos M, Aguilera CM, Cañete R, A. G. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr* 2006;96(2):201-26.
147. DAVIS. Hunger, ghrelin and the gut. *Brain Res.* 2018 15:154-8.
148. Buczkowska O. The role of ghrelin in the regulation of energy homeostasis. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw.* 2005;11(1):39-42.
149. Lago F, Gonzalez-Juanatey JR, Casanueva FF, Gómez-Reino J, Dieguez C, O G. Ghrelin, the same peptide for different functions: player or bystander? . *Vitam Horm.* 2005;71:405-32.
150. De Vriese C, Perret J, C D. Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition.* 2010 26(6):579-84.
151. Laviano MU, Rianda S, Fanelli RF. Receptor for growth hormone secretagogue (Ghs-R). *Curr Pharm* 2012;18(31):4749-54.
152. Hansson C, Alvarez-Crespo H, Taube H, Skibicka KP, Schmidt G, Karlsson-Lindahl G, et al. Influence of ghrelin on the serotonergic signaling system central in mice. *jneuropharm.* 2013;79:498-505.
153. Choi HJ, Ki KH, JY Yang, Jang BY, Song JA, WY Baek, et al. Chronic central administration of ghrelin increases bone mass through an independent mechanism of appetite regulation. *PLoS One.* 2013;8(7):655.
154. Legio L, Zywiak WH, Fricchione SR, Edwards SM, from Mt SM, Swift RM. Intravenous administration of ghrelin increases the desire for heavy drinkers dependent on alcohol: preliminary investigation. *GA. Psychiatry Biol.* 2014;76(9):734-41.
155. Akamizu T, K K. The physiological significance and potential clinical applications of ghrelin. *Eur J Intern Med.* 2012;23(3):197-202.
156. Seki. Unexpected effect of the appetite-stimulating hormone ghrelin on ENaC: hunger for sodium? *Kidney Int.* 2013 84(3):438-40.
157. Yongue, MM M. Cosegregation analysis of salt appetite and blood pressure in genetically hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 1988;10(2):323-43.

158. Di Nicolantonio R, MJ S. Blood pressure, salt appetite and mortality of genetically hypertensive and normotensive rats maintained on high and low salt diets from weaning. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1988;15(10):741-51.
159. Di Nicolantonio R, Silvapulle MJ SS, TO M. High salt diet decreases longevity in the spontaneously hypertensive rat. . *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1988;15(4):357-9.
160. Klok SJ, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review *Appetite Regulatory Peptides* 2006.
161. Hurley SW, AK J. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. *Pflugers Arch*. 2015;467(3):445-56.
162. Gong Y, Liu Y, Guo Y, Su M, Zhong Y, Xu L, et al. Ghrelin projection from the lateral hypothalamus area to the dorsal vagal complex and its regulation of gastric motility in cisplatin-treated rats. *Neuropeptides*. 2017;66:69-80.
163. Takemi S, Sakata I, Kuroda K, Miyano Y, Mondal A, T S. The important role of ghrelin on gastric contraction in *Suncus murinus*. *Endocr Dev*. 2017;64:11-4.
164. Mondal A, Xie Z, Miyano Y, Sakata I, Kawamoto Y, Aizawa S, et al. Coordination of motilin and ghrelin regulates the migrating motor complex of gastrointestinal motility in *Suncus murinus*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;15:1207-15.
165. Kuroda K, Heqing H, Mondal A, Yoshimura M, Ito K, Mikami T, et al. Ghrelin Is an Essential Factor for Motilin-Induced Gastric Contraction in *Suncus murinus*. *Endocrinology*. 2015;156(12):4437-47.
166. Hashimoto H, Fujihara H, Kawasaki M, Saito T, Shibata M, Otsubo H, et al. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology*. 2007;148(4):1638-47.
167. Iglesias P, Díez JJ F-RM, Codoceo R, Alvarez-Fidalgo P, Bajo MA, Aguilera A, et al. Serum ghrelin concentrations in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(1):68-73.
168. Veroux M, Zerbo D, Basile G, Gozzo C, Sinagra N, Giaquinta A, et al. Simultaneous Native Nephrectomy and Kidney Transplantation in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *PLoS One*. 2016;3(11):155.
169. Freeman J. Peptides. Chronic central ghrelin infusion reduces blood pressure and heart rate despite increasing appetite and promoting weight gain in normotensive and hypertensive rats. *jpeptides*. 2013;42:35-42.

170. Qi Y, Inoue K, Fu M1, Inui A, H H. Chronic overproduction of ghrelin in the hypothalamus leads to temporal increase in food intake and body weight. *Neuropeptides*. 2015;50:23-8.
171. McKiernan F, Houchins JA, RD M. Relationships between human thirst, hunger, drinking, and feeding. *Physiol Behav*. 2008;90(5):7700-8.
172. Mattes. Hunger and thirst: issues in measurement and prediction of eating and drinking. *Physiol Behav*. 2010;100(1):22-32.
173. El Khoury D, Panahi S, Luhovyy BL, Douglas Goff H, G HA. Interaction of mealtime ad libitum beverage and food intake with meal advancement in healthy young men and women. . *Physiol Behav*. 2015:39-44.
174. Sun Y, Garcia JM, RG S. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor expression in mice during aging. *Endocrinology*. 2007;148(3):1323-9.
175. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003 Feb 20;37(4):649-61.
176. Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Cragg P, Shirai M, et al. One dose of ghrelin prevents the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone aftermyocardial infarction. *Endocrinology*. 2012;153(5):2436-43.
177. Isgaard J, A B, I J. Cardiovascular effects of ghrelin and growth hormone secretagogues. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2008;8(2):133-7.
178. Tokudome T, Otani K, Miyazato M, K K. Ghrelin and the heart. *Peptides*. 2018;18:30104-9.
179. Seravalle G, Mancina G, G G. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2014;21(2):89-105.
180. Santos. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2014;63:1138-47.
181. Ishizaki S, Murase T, Sugimura Y, Kakiya S, Yokoi H, Tachikawa K, et al. Role of ghrelin in the regulation of vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology*. 2002;143(5):1589-93.
182. Haam J, Halmos KC, Di S, JG T. Nutritional state-dependent ghrelin activation of vasopressin neurons via retrograde trans-neuronal-glia stimulation of excitatory GABA circuits. *J Neurosci*. 2014;34(48):6201-13.

183. Yang D, Liu Z, Z Y. Ghrelin and its relation with N-terminal brain natriuretic peptide, endothelin-1 and nitric oxide in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Cardiology*. 2013;124(4):241-5.
184. Zhao Z, T S. Characteristic features of ghrelin cells in the gastrointestinal tract and the regulation of stomach ghrelin expression and production. *World J Gastroenterol*. 2008;14(41):6306-11.
185. Roman R. Altered pressure-natriuresis relationship in young spontaneously hypertensive rats. . *Hypertension*. 1987;9(6):30-6.
186. Adrogue HJ, NE M. The impact of sodium and potassium on hypertension risk. *Semin Nephrol*. 2014;34(3):257-72.
187. Takahashi S, Tanaka F, Yonekura Y, Tanno K, Ohsawa M, Sakata K, et al. The urine albumin-creatinine ratio is a predictor for incident long-term care in a general population. *PLoS One*. 2018;13(3):195013.
188. Delanaye P, JM K. Evaluation of glomerular filtration rate in 2014. *Rev Med Liege*. 2014;69:47-52.
189. Yonezawa Y, Horinaka S, Shirakawa C, Y K. Estimated glomerular filtration ratio is a better index than creatinine clearance (Cockcroft-Gault) for predicting the prevalence of atrial fibrillation in the general Japanese population. *Hypertens Res*. 2018;41(6):451-9.
190. Drion I, Joosten H, Dikkeschei LD, Groenier KH, . BH. eGFR and creatinine clearance in relation to metabolic changes in an unselected patient population. *Eur J Intern Med*. 2009 722-7.
191. Jotwani V, Katz R IJ, Gutiérrez OM, Bennett M5, Parikh CR, Cummings SR, et al. Urinary Biomarkers of Kidney Tubular Damage and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality in Elders. *Am J Kidney Dis*. 2018;18:30104-5.
192. Ikegawa S, Matsuoka KI, Inomata T, Ikeda N, Sugiura H, Kuroi T, et al. Mild renal dysfunction defined by creatinine clearance rate has limited impact on clinical outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2018 107(5):568-77.
193. Otagiri. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *Journal of Endocrinology*. 2009;201:341-9.
194. Date. Ghrelin and the vagus nerve. *Methods Enzymol*. 2012;514:261-9.
195. Yasuda. Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *NeurosciLett*. 2003;349(2):75-8.

196. Soeki. Effect of ghrelin on autonomic activity in healthy volunteers. *Peptides*. 2014;62:1-5.
197. Krapalis AF, Reiter J, Machleidt F, Iwen KA, Dodt C, Lehnert H, et al. Ghrelin modulates baroreflex-regulation of sympathetic vasomotor tone in healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(11):1305-12.

## 8. ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 07 de março de 2016.

### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 073/2015

**I - Finalidade do projeto de pesquisa:** Pesquisa

**II - Identificação:**

**Título do projeto:**

Efeitos da administração de grelina sobre a modulação autonômica da função renal em animais hipertensos

**Pesquisador Responsável/ Unidade:**

Elder Sales da Silva / ICB – Lab. Fisiologia

**□ Pesquisadores Participantes:**

Reginaldo Nassar Ferreira – ICB

Carlos Henrique Xavier Custódio - ICB

**Unidade onde será realizado:**

Departamento de Ciências Fisiológicas. Laboratório de Fisiologia e Terapêutica Cardiovascular

**□ Data de apresentação a CEUA** 28/09/2015

**III - Objetivos e justificativa do projeto:**

**Geral:**

- Investigar os efeitos da administração de grelina sobre a modulação autonômica da função renal em animais hipertensos

**Específicos:**

- Avaliar a influência da grelina sobre o nível de catecolaminas séricas e do metabólito urinário ácido vanilmandélico em animais normotensos e hipertensos;

- Avaliar a influência da grelina na reatividade vascular ao agonista alfa adrenérgico fenilefrina e à acetilcolina em anéis isolados de artéria renal de animais normotensos e hipertensos;

- Avaliar o efeito da grelina no fluxo sanguíneo da artéria renal em animais normotensos e hipertensos.

**IV - Sumário do projeto:**

**Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**

Espera-se a partir do estudo proposto, descortinar, pelo menos em parte, a influência ou não, da grelina no que se refere à modulação autonômica da função renal em ratos hipertensos. Os resultados obtidos poderão ilustrar o efeito desse hormônio tanto ao nível central pela mediação simpática ou parassimpática e os efeitos periféricos como a atividade dos vasos sanguíneos. Os achados obtidos poderão reforçar a necessidade de estudos adicionais que estreitam o conhecimento do mecanismo de ação desse hormônio, sua representatividade nos sistemas de feedback e, a partir daí, colocar esse hormônio ainda mais evidente como um dos elementos chaves da manutenção homeostática. Este contexto pode contribuir para a área básica e também a área aplicada das ciências sendo a saúde humana um dos grandes focos.

Não há possibilidade do uso de métodos alternativos que permitam a obtenção dos resultados espere

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



**Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):**

Espécie	Linhagem	Idade*	Peso aprox.*	Quantidade Machos
<i>Rattus norvegicus</i>	WISTAR		270-330g	200
<i>Rattus norvegicus</i>	SHR		270-330g	200
<b>TOTAL:</b>				<b>400</b>

**Espécie e número total de animais utilizados:** *Rattus norvegicus* (Wistar e SHR), machos, 400 indivíduos

**Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**

Os experimentos serão realizados em ratos *Wistar* e SHR (ratos espontaneamente hipertensos), pesando entre 270-330g, provenientes do **Centro de Bioterismo (CEBIO)** da Universidade Federal de Goiás. Os animais serão alojados em gaiolas individuais (47cm x 31cm x 16cm) de acrílico com livre acesso à água e ração e com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os protocolos experimentais serão realizados de acordo com as normas de uso de animais.

Gaiolas metabólicas de acrílico acomodando um animal nas condições já descritas

Os animais serão acomodados e monitorados em sala reservada em condições de temperatura, umidade, ventilação e luminosidade controladas 12/12h

Sala 3 metros quadrados, estantes metálicas com posicionamento da gaiola metabólica

Será acomodado e monitorado um animal por cada gaiola metabólica

Estrado metálico da gaiola metabólica – (Fabricante: Tecniplast)

As condições são laboratoriais básicas de controle de luminosidade, umidade, ruídos, temperatura e dieta para o acompanhamento, sem sofrimento, do animal.

**Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não será utilizado agente infeccioso. Os pesquisadores/alunos não estão sujeitos a riscos. O projeto será executado nas dependências do Lab. de fisiologia da UFG, e as pessoas envolvidas atuarão nas atividades de manejo e fases experimentais, ocasião em que serão utilizados EPI's. A equipe é a treinada para evitar imprevistos e erros.

**Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** Os pesquisadores relatam sobre treinamento da equipe.

**Método de eutanásia:** Após realização dos procedimentos cirúrgicos os animais serão eutanasiados com Tiopental  $\geq$  40mg (i.v.)

**Destino do animal:** Os animais serão acondicionados em Saco de lixo devidamente lacrado e encaminhado a uma câmara fria a espera da empresa de recolhimento e incineração.

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -  
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



**V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:**

- Quanto a documentos:** O processo consta com todos os documentos exigidos pela CEUA e o conteúdo do CD enviado está de acordo com as normas.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os pesquisadores relatam sobre o treinamento da equipe, sobre condições de alojamento dos animais, aspectos sanitários. Relatam também sobre cuidados com os pesquisadores quanto a utilização de EPI's.

**VI - Parecer da CEUA:**

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**. Lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 11/2019.

**VII - Data da reunião: 07/03/2016**

**Dra. Renata Mázaro e Costa**

Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG