

## Originales

### VASODILATOR EFFECT OF GHRELIN IN THE RAT AORTA

**Background and objective:** Ghrelin is a hormone mainly produced by the stomach and has been identified as the natural ligand of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). In addition to its orexigenic effect, ghrelin modulates homeostasis of the cardiovascular system. The aim of this study was to analyze the effect of ghrelin on the vascular reactivity of the aorta.

**Material and methods:** This study was performed in the thoracic aorta of 10-12-week-old male Wistar rats. Passive wall tension and contractile responses to angiotensin II (Ang II) ( $10^{-7}$  mol/l) in the presence of ghrelin ( $10^{-8}$  mol/l) were evaluated using the organ bath system. The presence of the functional ghrelin receptor, GHS-R 1a, in vascular smooth muscle cells (VSMCs) of the aorta was determined by Western blot.

**Results:** VSMCs of the vascular wall of the aorta expressed the GHS-R 1a protein. Incubation of the intact aorta with ghrelin ( $10^{-8}$  mol/l) induced a reduction ( $p < 0.01$ ) in passive wall tension. In endothelium-denuded aorta, ghrelin did not modify basal vasomotor tone. However, incubation of endothelium-denuded aorta with ghrelin inhibited ( $p < 0.01$ ) Ang II ( $10^{-7}$  mol/l)-induced vasoconstriction.

**Conclusions:** Ghrelin exerts an endothelium-dependent and -independent depressor action on aortic vascular reactivity. These findings provide additional information on the physiological effect of ghrelin on arterial pressure regulation.

*Key words:* Ghrelin. Angiotensin II. Smooth muscle. Obesity. Hypertensión.

## Efecto vasodilatador de la ghrelina en la aorta de rata

AMAIA RODRÍGUEZ<sup>a,d</sup>, JAVIER GÓMEZ-AMBROSI<sup>a,d</sup>, VICTORIA CATALÁN<sup>a,d</sup>, SARA BECERRIL<sup>a,d</sup>, NEIRA SÁINZ<sup>a,d</sup>, BEATRIZ RAMÍREZ<sup>a,d</sup>, JAVIER SALVADOR<sup>b,d</sup>, JAVIER DíEZ<sup>c</sup>, ANA FORTUÑO<sup>c</sup> Y GEMA FRÜHBECK<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Investigación Metabólica. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

<sup>b</sup>Departamento de Endocrinología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

<sup>c</sup>Área de Ciencias Cardiovasculares. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

<sup>d</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

**Antecedentes y objetivo:** La ghrelina es una hormona producida principalmente en el estómago, que actúa como ligando natural del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R). Además de su efecto orexigénico, la ghrelina es capaz de modular la homeostasis del sistema cardiovascular. El objetivo de este estudio consistió en analizar el efecto de la ghrelina en la reactividad vascular de la aorta.

**Material y métodos:** El estudio se realizó en la aorta torácica de ratas macho de 10-12 semanas de la estirpe Wistar. Se analizó la presión basal y la respuesta contráctil inducida por la angiotensina II ( $10^{-7}$  mol/l) en presencia de ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) en el sistema de baño de órganos. La presencia del receptor funcional de ghrelina, GHS-R 1a, en las células de músculo liso vascular (CMLV) de la aorta se detectó mediante *Western blot*.

**Resultados:** Las CMLV de la pared vascular de la aorta expresan la proteína de GHS-R 1a. La incubación en presencia de ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) en la aorta con endotelio produjo una disminución de la presión vascular basal ( $p < 0,01$ ). En la aorta sin endotelio, la ghrelina no modificó el tono vasomotor basal. Sin embargo, la preincubación de los anillos aórticos con ghrelina inhibió ( $p < 0,01$ ) la vasoconstricción inducida por la angiotensina II ( $10^{-7}$  mol/l).

**Conclusiones:** La ghrelina posee un efecto depresor de la reactividad vascular de la aorta tanto dependiente como independiente del endotelio. Estos hallazgos aportan información adicional del efecto fisiológico de la ghrelina en la regulación de la presión arterial.

*Palabras clave:* Ghrelina. Angiotensina II. Músculo liso. Obesidad. Hipertensión.

## INTRODUCCIÓN

La ghrelina fue identificada en 1999 como el ligando endógeno del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R)<sup>1</sup>. La ghrelina humana es un péptido orexigénico de 28 amino-

Este proyecto de investigación se ha realizado gracias a la financiación del Departamento de Salud del Gobierno de Navarra (4/2006). CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

Correspondencia: Dra. G. Frühbeck.

Departamento de Endocrinología. Clínica Universitaria de Navarra.

Avda. Pío XII, 36. 31008 Pamplona. Navarra. España.

Correo electrónico: gfruhbeck@unav.es

Manuscrito recibido el 19-5-2008 y aceptado para su publicación el 22-9-2008.

ácidos con una modificación n-octanoil en el residuo serina en posición 3. Esta hormona es sintetizada fundamentalmente por el estómago<sup>1</sup> y, en menor cantidad, por la hipófisis<sup>2</sup>, el hipotálamo<sup>3</sup>, el riñón<sup>4</sup>, el corazón<sup>5</sup>, el páncreas<sup>6</sup>, los testículos<sup>7</sup>, los ovarios<sup>8</sup> y la placenta<sup>9</sup>. El patrón de secreción de esta hormona se caracteriza por un aumento preprandial y una caída posprandial<sup>10</sup>. La ghrelina estimula el apetito y aumenta la ingesta mediante la activación de las neuronas hipotalámicas que contienen neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti (AgRP)<sup>11-13</sup>. Paradójicamente, los pacientes obesos presentan bajas concentraciones circulantes de ghrelina<sup>14</sup>.

La administración intravenosa de ghrelina en individuos sanos disminuye las cifras de presión arterial e incrementa el rendimiento cardíaco<sup>15</sup>. La presencia de GHS-R en corazón, aorta, arterias pulmonares y coronarias, así como en venas<sup>16,17</sup>, confirman la participación de la ghrelina en el control de la homeostasis del sistema cardiovascular. La ghrelina previene la apoptosis de células endoteliales y de cardiomiocitos, y en pacientes con coronariopatía se observa un aumento vascular de GHS-R, lo que indica un efecto cardioprotector de la ghrelina<sup>18</sup>. Asimismo, la ghrelina actúa como un agente vasodilatador mediante mecanismos dependientes e independientes del endotelio. Por un lado, la ghrelina actúa directamente en los vasos sanguíneos, mediante un efecto depresor con la producción de óxido nítrico (NO) endotelial<sup>19</sup>. Por otro lado, la ghrelina causa vasorrelajación independiente del endotelio, antagonizando la vasoconstricción inducida por la endotelina 1 (ET-1) en la arteria mamaria interna<sup>20</sup>.

Por todo lo expuesto anteriormente, se establece que la ghrelina participa en la homeostasis vascular mediante el estímulo de la producción de sustancias vasoactivas, como el NO, y antagonizando el efecto de agentes vasoconstrictores. La angiotensina II es un conocido péptido vasoactivo, especialmente implicado en el desarrollo de la hipertensión arterial, dada su capacidad de estimular la contracción de las células del músculo liso vascular (CMLV). En este contexto, la hipótesis de trabajo consiste en que la ghrelina contrarresta las acciones vasculares de la angiotensina II en la aorta de rata.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho de 10-12 semanas. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, en condiciones controladas de temperatura (20-22 °C), humedad (50-60%), ventilación (15 cambios completos de aire/h) y luz (de 8.00 a 20.00) en el estabulario del Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (CIFA) de la Universidad de Navarra. Las ratas se alimentaron con una dieta estándar isoenergética (13,39 mJ/kg) e isoproteínica (14%), con un contenido en sodio del 0,13% (2014S Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance

Diet, Harlan, Barcelona), y con acceso libre al agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron según las directrices del Comité de Ética y Uso de Animales de Experimentación de la Comunidad Europea (Directiva 86/609), habiendo sido aprobados los protocolos de experimentación por el Comité de Investigación de la Universidad de Navarra (011/99; 001/01). Las ratas se sacrificaron por decapitación y se realizó una toracotomía media para la obtención de la aorta torácica. Se disecó la porción descendente de la aorta torácica, comprendida entre el cayado aórtico y el diafragma.

### Detección de GHS-R en CMLV

Las CMLV se obtuvieron de la aorta torácica mediante digestión mecánica y enzimática, según el método de los explantes descrito por Neusser et al<sup>21</sup>. Las CMLV se homogeneizaron en la solución de lisis (PBS-EGTA 1 mmol, sacarosa 320 mmol/l) con inhibidores de proteinasas (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y se cuantificó el contenido proteínico de las muestras espectrofotométricamente, según el método descrito por Bradford<sup>22</sup>, utilizando seroalbúmina bovina (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) como estándar. Las muestras (30 µg) se desnaturalizaron al mezclarlas en proporción 1:1 con la solución de carga (4% SDS; 20% glicerol; 10% betamercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol; Tris 200 mmol; pH 6,80) y calentándolas a 100 °C durante 10 min. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%, y, posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos). El bloqueo de las membranas se realizó con una solución de *tris buffer* salino (TBS) (Tris 1 mmol/l, NaCl 150 mmol/l; pH 8) con un 0,05% de Tween y un 5% de leche desnatada durante 1 h a temperatura ambiente (RT). Seguidamente, se incubaron las membranas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-GHS-R de rata (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, Estados Unidos) a una dilución 1:500 en TBS al 0,05% de Tween y un 5% de leche desnatada durante toda la noche a 4 °C en agitación suave. Tras cinco lavados de 5 min con TBS al 0,05% de Tween, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) a una dilución 1:5.000 en TBS al 0,05% de Tween y un 5% de leche desnatada a RT durante 1 h en agitación suave y, a continuación, se lavaron cinco veces con TBS al 0,05% de Tween. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron por quimioluminiscencia mediante el sistema de detección ECL Plus (Amersham Biosciences). Tras la exposición de la membrana a una película autorradiográfica de alta sensibilidad, ésta se reveló en el sistema Diagnostic Imaging Processor RP X-OMAT 6MB (Kodak) y la imagen de la banda correspondiente a GHS-R se capturó en el sistema Gel Doc™ gel Documentation System, utilizando el programa Quantity One 4.5.0 (Bio-Rad).

### Preparación de los anillos aórticos con y sin endotelio

La limpieza mecánica de la aorta se realizó en una placa de Petri con PBS (NaCl 100 mmol/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mmol, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mmol/l, pH 7,4) suplementado con antibiótico-antimicótico (10.000 U/ml de penicilina G sódica,

10.000 µg/ml de sulfato de estreptomycin, 25 µg/ml de anfotericina B como Fungizone® al 0,85%) a 37 °C, para retirar los restos de sangre y el tejido perivascular. A continuación, se colocó la aorta en otra placa de Petri con la solución fisiológica Krebs-Henseleit a 37 °C con la siguiente composición (NaCl 112 mmol/l, KCl 5 mmol/l, CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O 2,5 mmol/l, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 1,2 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 29,76 mmol/l, glucosa 11,5 mmol, EDTA 0,016 mmol/l). El endotelio de la aorta se eliminó raspando suavemente el lumen vascular con una aguja de superficie rugosa. En algunos experimentos el endotelio se preservó con objeto de estudiar su participación en los efectos de la ghrelina. Posteriormente, se cortó la aorta en anillos de aproximadamente 2-3 mm. Los anillos aórticos se colocaron en el interior de las copas de un baño de órganos con 20 ml de solución de Krebs-Henseleit a 37 °C burbujeada de forma continua con carbógeno (mezcla del 95% O<sub>2</sub> y del 5% de CO<sub>2</sub>). Los anillos se sujetaron por medio de 2 soportes de acero inoxidable en forma de "L" introducidos en la luz vascular, uno de los cuales está fijo mientras que el otro se encuentra unido a un transductor de fuerza isométrico (TRI 110, Letica Scientific Instruments, Barcelona) acoplado a través de un amplificador (AMPO16/2, Letica Scientific Instruments). Los cambios de presión ejercidos por los anillos fueron recogidos y analizados mediante el programa informático Isolated Organs Acquisition Program (PRO-T05, Letica Scientific Instruments). Los anillos aórticos se mantuvieron a una presión basal de 2,5 g durante un período de estabilización de 1 h, cambiando la solución de Krebs-Henseleit cada 20 min y reajustando la presión, en el caso de que fuera necesario. El estado fisiológico de los anillos aórticos se evaluó observando la respuesta inducida por la incubación de éstos en 20 ml de solución de KCl 80 mmol/l (NaCl 37 mmol/l, KCl 80 mmol/l, CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O 2,5 mmol/l, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 1,2 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 29,76 mmol/l, glucosa 11,5 mmol/l, EDTA 0,016 mmol/l). La ausencia o la presencia de endotelio funcional se verificó con acetilcolina 10<sup>-5</sup> mol (Sigma) en los anillos precontraídos con KCl 80 mmol. A continuación, los anillos se lavaron y ajustaron hasta obtener, de nuevo, una línea basal estable.

### Obtención de la curva concentración-respuesta a la angiotensina II en anillos aórticos con y sin endotelio

En un primer grupo de experimentos, se definió la curva concentración-respuesta no acumulada a la angiotensina II (10<sup>-9</sup>-10<sup>-6</sup> mol/l) en los anillos aórticos con y sin endotelio de las ratas Wistar para evaluar la concentración a utilizar en experimentos posteriores. La curva se obtuvo añadiendo una única concentración de angiotensina II (Sigma) al medio de incubación, para evitar la desensibilización de los receptores de angiotensina II. Los resultados se expresaron como %R, calculado como la variación de la presión basal inducida por la concentración de angiotensina II (P<sub>A</sub>, mg) respecto a la variación inducida por la solución de KCl 80 mmol/l (P<sub>B</sub>, mg), considerada como el 100% de respuesta; el porcentaje de respuesta se calcula mediante la siguiente fórmula: %R = [P<sub>A</sub> (mg) / P<sub>B</sub> (mg)] × 100. A partir de la curva concentración-respuesta a la angiotensina II se determinó el valor de la concentración eficaz media (CE<sub>50</sub>; concentración a la cual se obtiene un 50% de la contracción máxima) y pD<sub>2</sub> (= -log CE<sub>50</sub>).

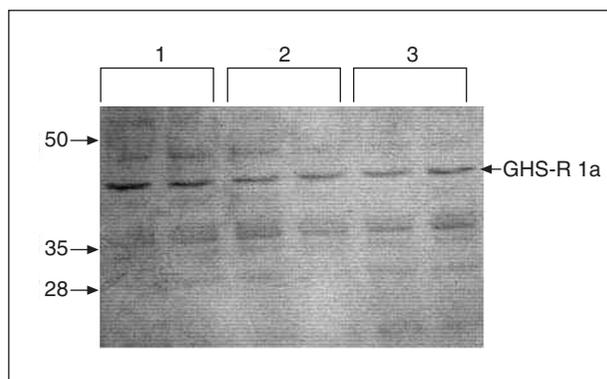


Fig. 1. Análisis de la expresión del receptor ghrelina (GHS-R) en células de músculo liso de la aorta de ratas Wistar mediante Western blot, mediante un anticuerpo policlonal anti-GHS-R. Se observó una banda de 46 kDa en todos los experimentos realizados (n = 10). En la figura se muestra una imagen representativa de la expresión de GHS-R por duplicado en homogenizados de células de músculo liso vascular de 3 ratas. En el margen izquierdo se muestran los tamaños del peso molecular del marcador.

### Determinación del efecto de la ghrelina en la respuesta inducida por la angiotensina II en anillos aórticos con y sin endotelio

En un segundo grupo de experimentos, los anillos aórticos sin endotelio e intactos de rata Wistar se preincubaron durante 30 min con ghrelina acetilada (10<sup>-8</sup> mol/l) (Tocris, Ellisville, MO, Estados Unidos), para estudiar su efecto en la presión basal y la vasoconstricción inducida por la angiotensina II (10<sup>-7</sup> mol/l). Las concentraciones de ghrelina y angiotensina II se seleccionaron en función de trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio y por otros autores<sup>19,23</sup>. Uno de los anillos aórticos obtenidos se reservó como control, y se incubó con el disolvente de ghrelina. Los resultados se expresaron como %R, calculado como la variación de la presión basal inducida por la angiotensina II (10<sup>-7</sup> mol/l) en presencia o ausencia de la correspondiente concentración de ghrelina (P<sub>A</sub>, mg) respecto a la variación inducida por la solución de KCl 80 mmol/l (P<sub>B</sub>, mg), considerada como el 100% de respuesta; el porcentaje de respuesta se calcula mediante la fórmula indicada en el apartado anterior.

### Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los experimentos se representaron como media aritmética ± error estándar (ES). El cálculo de la CE<sub>50</sub> se efectuó a partir de la recta obtenida por regresión no lineal, representando el logaritmo de la concentración de angiotensina II frente a los valores de respuesta transformados en unidades logit<sup>24</sup>. La transformación logarítmica de los datos en unidades logit para calcular la CE<sub>50</sub>, se realizó mediante la siguiente ecuación: logit = -log [(100 - %R) / %R]. Para los valores de CE<sub>50</sub>, se utilizó el intervalo de confianza (IC) para la media del 95% como medida de dispersión. Las diferencias estadísticas entre las medias muestrales se analizaron mediante la prueba de la t de Student no apareada. La significación estadística se situó en p < 0,05 en todos los análisis. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS para Windows versión 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

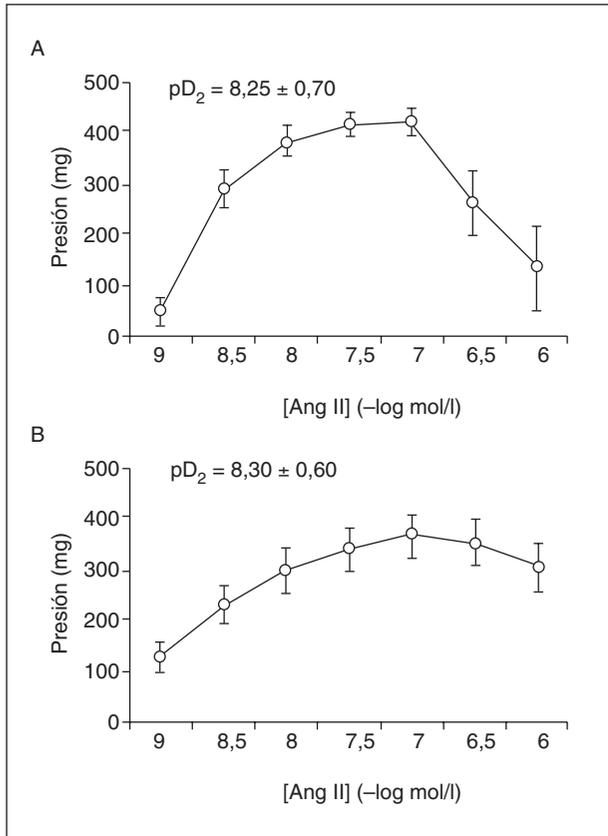


Fig. 2. Curva concentración-respuesta de la contracción inducida por la angiotensina II (Ang II) en anillos aórticos intactos (A) y sin endotelio (B) de ratas Wistar. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar de, al menos, 10 determinaciones por concentración. En la parte superior del gráfico se indica el valor de  $pD_2$  calculado como el  $-\log CE_{50}$ .

## RESULTADOS

### Expresión de GHS-R en CMLV de la aorta

La expresión de la proteína de GHS-R se analizó mediante la técnica de *Western blot*. En todos los experimentos realizados ( $n = 10$ ) para detectar la proteína de GHS-R en lisados de células de músculo liso de la aorta de ratas Wistar, se observó una banda de 46 kDa, como se muestra en la figura 1. Esta banda corresponde a GHS-R 1a, el receptor funcional de la ghrelina<sup>25</sup>. En ausencia del anticuerpo primario no se observó inmunorreactividad en las membranas.

### Respuesta inducida por la angiotensina II en anillos aórticos con y sin endotelio

La angiotensina II indujo una potente respuesta contráctil dependiente de la concentración en los anillos aórticos intactos y libres de endotelio de rata Wistar (fig. 2). Los valores de  $CE_{50}$  calculados para la curva concentración-respuesta a la angiotensina II fueron  $5,6 \cdot 10^{-9}$  mol/l (IC del 95%,  $1,6 \cdot 10^{-9}$ ;  $2,1 \cdot 10^{-8}$

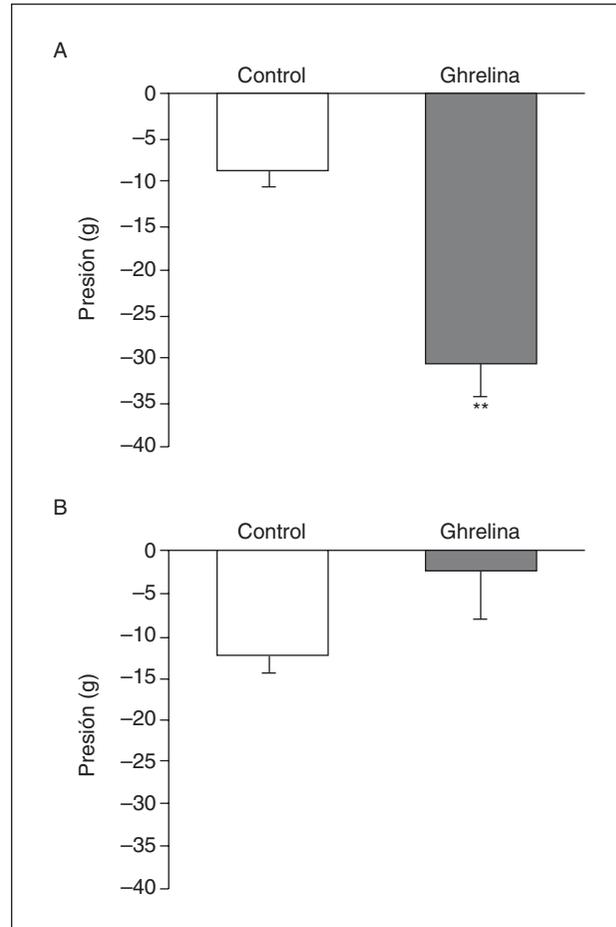


Fig. 3. Efecto de la ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) en la presión basal de anillos aórticos intactos (A) y sin endotelio (B) de ratas Wistar. Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de, al menos, 10 determinaciones. \*\* $p < 0,01$  respecto al cambio de presión basal en ausencia de ghrelina según el test de la *t* de Student no apareado.

mol/l) en los anillos aórticos intactos y  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l (IC del 95%,  $1,4 \cdot 10^{-9}$ ;  $1,9 \cdot 10^{-8}$  mol/l) en los anillos aórticos sin endotelio. Cada anillo aórtico se estimuló con una única concentración de angiotensina II, para evitar la desensibilización de los receptores de angiotensina II. A partir de la curva concentración-respuesta, se seleccionó la concentración de angiotensina II  $10^{-7}$  mol/l para realizar los siguientes experimentos.

### Efecto de la ghrelina en la respuesta inducida por la angiotensina II en los anillos aórticos intactos y sin endotelio de rata Wistar

En los anillos aórticos intactos de rata Wistar la preincubación con ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) produjo una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de la presión basal (fig. 3A). Por el contrario, la ghrelina no modificó ( $p = 0,235$ ) el tono vasomotor basal de la aorta sin endotelio de rata Wistar (fig. 3B). La preincubación con ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) no interfiere en la respuesta con-

tráctil a la angiotensina II ( $10^{-7}$  mol/l) de los anillos aórticos intactos de rata Wistar (fig. 4A). En cambio, la ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) inhibió significativamente la contracción inducida por la angiotensina II ( $10^{-7}$  mol/l) en los anillos aórticos sin endotelio de rata Wistar ( $p < 0,01$ ) (fig. 4B).

## DISCUSIÓN

La ghrelina tiene un importante papel en la homeostasis del sistema cardiovascular. El principal hallazgo de este estudio es que la ghrelina es capaz de inducir una relajación dependiente del endotelio en la aorta y contrarrestar la vasoconstricción del péptido vasoactivo angiotensina II en la aorta sin endotelio a través de su receptor funcional, GHS-R 1a.

En el presente estudio se ha confirmado la presencia del receptor funcional de ghrelina, GHS-R 1a, en las CMLV de la aorta de rata Wistar. La banda detectada con un peso molecular aproximado de 46 kDa corresponde a GHS-R, ya que se corresponde con el tamaño descrito para otros tipos celulares. Estudios previos habían insinuado la presencia de GHS-R en las CMLV, dada su expresión en la aorta completa<sup>16</sup>. Asimismo, se había indicado la funcionalidad de GHS-R en las CMLV, con un efecto hipotensor directo, ya que es capaz de disminuir la contracción inducida por la ET-1 en la arteria mamaria humana sin endotelio<sup>20</sup>. Los hallazgos del presente estudio muestran el efecto inhibitorio de la ghrelina en la contracción inducida por la angiotensina II en la aorta sin endotelio. La angiotensina II es un potente agente vasoconstrictor, dada su capacidad de movilizar el calcio secuestrado en el retículo sarcoplásmico y favorecer la entrada de calcio extracelular en las CMLV<sup>26</sup>. En conjunto, nuestros datos y los de otros autores indican que la ghrelina tiene una función depresora en los vasos sanguíneos, actuando directamente en su receptor, GHS-R 1a, expresado en la pared vascular.

A fin de mejorar el significado fisiológico del efecto depresor de la ghrelina en la aorta, los efectos de la hormona se probaron, asimismo, en la aorta intacta. Diversos estudios han demostrado que el endotelio tiene un papel crucial en el efecto vascular de la ghrelina, ya que favorece la liberación de NO mediante la activación de la NO sintetasa endotelial (eNOS)<sup>19</sup> y, en consecuencia, da lugar a una vasodilatación dependiente del endotelio<sup>27,28</sup>. Los datos del presente estudio corroboran los resultados publicados por estos autores, ya que la ghrelina es capaz de disminuir la presión basal de la aorta intacta, un hecho que no se manifiesta tras la incubación de la hormona con anillos aórticos sin endotelio. Sin embargo, la ghrelina no es capaz de inhibir la contracción inducida por la angiotensina II en la aorta con endotelio. El efecto vasodilatador de la ghrelina podría verse superado por el efecto vasoconstrictor de la angiotensina II, dada la capacidad de este péptido vasoactivo de producir es-

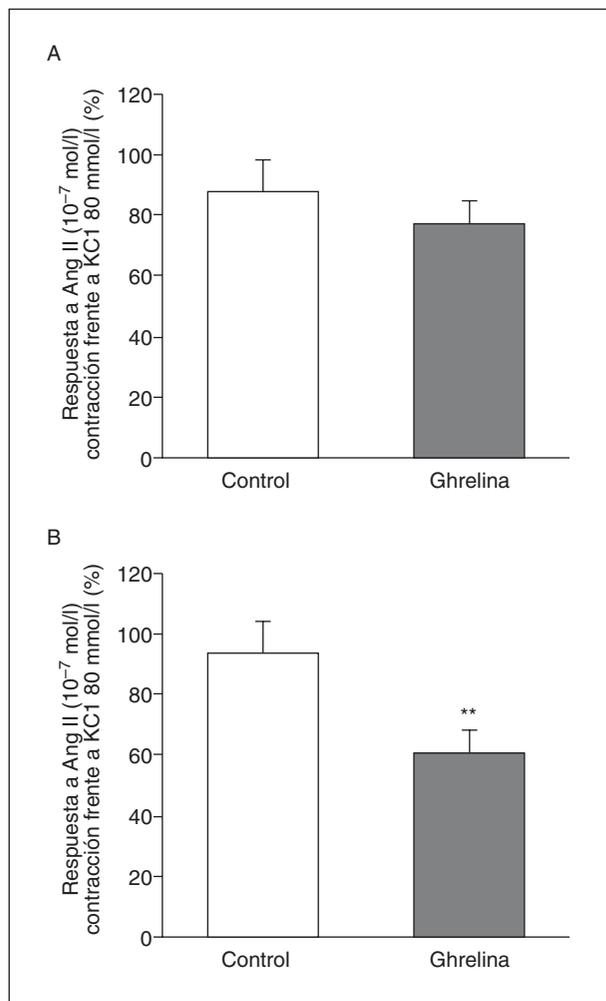


Fig. 4. Efecto de la ghrelina ( $10^{-8}$  mol/l) en la contracción inducida por la angiotensina II (Ang II) ( $10^{-7}$  mol/l), en anillos aórticos intactos (A) y sin endotelio (B) de ratas Wistar. Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de, al menos, 10 determinaciones. \*\* $p < 0,01$ , respecto a la respuesta control en ausencia de ghrelina según el test de la t de Student no apareado.

pecies reactivas del oxígeno, que contrarrestaría la dilatación inducida por el NO endotelial<sup>29</sup>.

En resumen, nuestros datos muestran la localización de los receptores funcionales de ghrelina, GHS-R 1a, en la pared vascular de la aorta. Las CMLV de la pared vascular de la aorta constituyen una diana para la ghrelina, ya que esta hormona es capaz de inhibir la vasoconstricción inducida por la angiotensina II en la aorta sin endotelio. Este hecho aporta información adicional sobre los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de la hipertensión relacionada con la obesidad, tal como la pérdida del antagonismo de la angiotensina II. Esta suposición se apoya en dos argumentos: a) la obesidad se caracteriza por bajas concentraciones circulantes de ghrelina<sup>14</sup> y una sobreestimulación de ghrelina, y b) una sobreestimulación del sistema renina-angiotensina<sup>30</sup>. La investigación de esta nueva acción

vascular de la ghrelina en la hipertensión arterial relacionada con la obesidad permitiría dilucidar la relevancia fisiopatológica de esta hormona en el desarrollo de ambas enfermedades.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402:656-60.
- Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine*. 2001;14:101-4.
- Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, et al. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett*. 2002;321:157-60.
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*. 2000;486:213-6.
- Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M, Gallego R, Diéguez C, Gualillo O, et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2004;62:481-8.
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*. 2002;107:63-9.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002;143:717-25.
- Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:879-87.
- Gualillo O, Caminos JE, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*. 2001;142:788-94.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50:1714-9.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000;407:908-13.
- Druce MR, Wren AM, Park AJ, Milton JE, Patterson M, Frost G, et al. Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:1130-6.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarh DT, Adams JR, Frazier EG, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*. 2004;145:2607-12.
- Tschöp M, Weyer C, Tataranni A, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001;50:707-9.
- Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2001;280:R1483-7.
- Muccioli G, Broglio F, Valetto MR, Ghe C, Catapano F, Graziani A, et al. Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2000;61:27-31.
- Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3803-7.
- Katugampola SD, Kuc RE, Maguire JJ, Davenport AP. G-protein-coupled receptors in human atherosclerosis: comparison of vasoconstrictors (endothelin and thromboxane) with recently de-orphanized (urotensin-II, apelin and ghrelin) receptors. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103:S171-5.
- Iantorno M, Chen H, Kim JA, Tesauro M, Lauro D, Cardillo C, et al. Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E756-64.
- Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol*. 2002;136:1146-52.
- Neusser M, Tepel M, Golinski P, Holthues J, Spieker C, Zhu Z, et al. Different calcium storage pools in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens*. 1994;12:533-8.
- 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;72:248-54.
- Rodríguez A, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Sáinz N, Díez J, et al. The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction is blunted in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2006;24:1589-97.
- Pastor-Barriuso R, Guallar E, Coresh J. Transition models for change-point estimation in logistic regression. *Stat Med*. 2003;22:1141-62.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996;273:974-7.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyperresponsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997;15:1431-9.
- Okumura H, Nagaya N, Enomoto M, Nakagawa E, Oya H, Kangawa K. Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:779-83.
- Tesauro M, Schinzari F, Iantorno M, Rizza S, Melina D, Lauro D, et al. Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation*. 2005;112:2986-92.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, et al. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 2001;38:1395-9.
- Barton M, Carmona R, Morawietz H, D'Uscio LV, Goettsch W, Hillen H, et al. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension*. 2000;35:329-36.