UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

FELIPE DE LIMA FAIM

**Efeito da ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em animais submetidos à
endotoxemia**

Ribeirão Preto
2018

FELIPE DE LIMA FAIM

**Efeito da ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em animais submetidos à
endotoxemia**

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Evelin Capellari Cárnio

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

FAIM, Felipe de Lima

Efeito da ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em animais submetidos à endotoxemia

Ribeirão Preto-SP-2014

125 pág.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Cárnio, Evelin Capellari

1. Ghrelina 2. GH 3. IGF-1 4. Endotoxemia 5. Inflamação. 6. Eixo GH/IGF-1

Nome: FAIM, Felipe de Lima

Título: Efeito da ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em animais submetidos à endotoxemia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À Deus por me proporcionar essa jornada chamada vida.

À minha mãe, por todo apoio, amor e carinho. Por ser meu porto seguro.

Ao meu pai, por sempre acreditar no meu potencial e pelo seu amor por mim.

Ao meu padastro Claudio, por todo incentivo e carinho.

Aos meus irmãos Tiago, Vitor, Bia, Bruno, Naty e Poly.

À Patrícia, meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Evelin Capellari Cárnio por acreditar em mim e sempre torcer pelo meu sucesso. Por todos momentos que passamos, pelas oportunidades únicas que me concedeu, pelos ensinamentos, ao longo de toda pós-graduação, e pela grande amizade que desenvolvemos.

Aos professores que aceitaram participar da minha banca de defesa do doutorado.

À Prof^a. Dr^a. Angelita Maria Stabile por colaborar com meu trabalho ao realizar, me ensinar e discutir os resultados dos experimentos de Western Blott. Por toda nossa amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Riccardo Lacchini por colaborar com meu trabalho ao realizar, me explicar e discutir meus resultados dos experimentos de PCR-RT.

Aos Professores Dr. José-Antunes Rodrigues e Dr^a. Lucila Leico K. Elias, pelas dosagens de corticosterona realizada em seu laboratório.

À Msc. Patrícia Passaglia por me ajudar durante todo o trabalho, discutindo, ensinando, sugerindo, corrigindo, participando ativamente dos experimentos e agregando valor à minha tese.

Ao Msc. e especialista de laboratório Marcelo Eduardo Batalhão pela dosagem de nitrato e por todos os anos de companheirismo, ensinamentos e ajuda.

Ao meu Prof. de graduação, Dr. Henry Maia Peixoto, por ser um exemplo de profissional que levo comigo até hoje.

Aos meus outros colegas de laboratório, André e Aline, por todos os bons momentos que compartilhamos.

Aos meus amigos e familiares de longas datas por fazerem parte da minha história.

RESUMO

FAIM, Felipe de Lima. Efeito da ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em animais submetidos à endotoxemia. 2018. 125 f. Tese (doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Durante a endotoxemia, observa-se alteração no eixo hormônio do crescimento (GH)/fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1. Acredita-se que o aumento de citocinas pró-inflamatórias seja responsável por essa alteração, apesar do mecanismo para essa alteração ainda não estar completamente elucidado. A ghrelina é um hormônio peptídico que apresenta propriedades anti-inflamatórias, e, portanto, pode contribuir para a manutenção da integridade do eixo GH/IGF-1. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento sistêmico de ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em ratos *Wistar* submetidos à endotoxemia. Para a indução da endotoxemia, foi administrado lipopolissacarídeo (LPS; 5mg/kg intraperitoneal) sistemicamente. Os animais foram tratados com ghrelina (15nmol/kg; endovenoso) concomitantemente à administração de LPS e tiveram o sangue e o fígado coletados após 2h, 6h ou 12h. Foram quantificadas a concentração sanguínea do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , IL-6, nitrato, corticosterona, GH, IGF-1 e ghrelina endógena, assim como a concentração hepática de TNF- α , IL-1 β e IL-6. O TNF- α , IL-1 β , IL-6, GH, IGF-1 e ghrelina endógena foram quantificados pela técnica de ELISA. A corticosterona foi quantificada pela técnica de radioimunoensaio. O Nitrato foi quantificado pela técnica de quimioluminescência. Também foram quantificadas a expressão proteica hepática do receptor do hormônio secretador do GH (GHSR-1a) e do receptor do GH (GHR) pela técnica de *Western Blott*, bem como a expressão gênica hepática de IGF-1 e GHR pela técnica de PCR-RT. Os ratos submetidos à endotoxemia apresentaram redução sérica de IGF-1 e de GH, caracterizando a alteração do eixo GH/IGF-1. Os animais endotoxêmicos e tratados com ghrelina apresentaram menor redução dos níveis circulantes de IGF-1, além de apresentarem menores níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e nitrato após administração de LPS. A menor redução de IGF-1 circulante após o tratamento com ghrelina não foi relacionada a alterações na expressão proteica de GHSR-1a ou GHR, nem relacionada a alterações na expressão gênica de IGF-1 ou GHR nos intervalos de tempo analisados. Portanto, a propriedade anti-inflamatória da ghrelina levou à redução do aumento dos mediadores pró-inflamatórios e contribuiu para a manutenção da integridade do eixo GH/IGF-1 ao atenuar a queda na concentração sanguínea de IGF-1.

Palavras-chave: Ghrelina. GH. IGF-1. Endotoxemia. Inflamação. Eixo GH/IGF-1

ABSTRACT

FAIM, Felipe de Lima. The ghrelin effect on the GH/IGF-1 axis on animals submitted to endotoxemia. 2018. 125 f. Thesis (PhD - Doctor of Philosophy – concentration area: Sciences) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

During the endotoxemia it is possible to observe a change on the growth hormone (GH) /insulin-like growth factor (IGF)-1 axis. It is believed that the pro inflammatory cytokines increase is responsible for this change even not having the mechanism for this change completely elucidated. The ghrelin is a peptidic hormone which has anti-inflammatory properties and, because of that, can contribute to the GH/IGF-1 axis integrity maintenance. This research goal is to evaluate the ghrelin systemic treatment effect on the GH/IGF-1 axis on *Wistar* rats submitted to endotoxemia. To induce the endotoxemia it was given systemically to the rats a lipopolysaccharide (LPS; 5mg/kg intraperitoneal). The animals were treated with ghrelin (15nmol/kg; intravenous) while receiving the LPS and they had their blood and liver collected after 2h, 6h or 12h. Blood concentration of alfa tumoral necrose (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, nitrate, corticosterone, GH, IGF-1 and endogenous ghrelin were quantified as well as their TNF- α , IL-1 β e IL-6 hepatic concentration. The TNF- α , IL-1 β , IL-6, GH, IGF-1 and the endogenous ghrelin were quantified through the ELISA technique. The corticosterone was quantified through the radioimmunoassay technique. The nitrate was quantified through the chemiluminescence technique. The hepatic protein expression from the growth hormone secretagogue receptor (GHSR)-1a and the receptor of the GH (GHR) were quantified through the *Western Blott* technique and the IGF-1 and the GHR hepatic gene expression through the PCR-RT technique. The rats submitted to the endotoxemia presented an IGF-1 and a GH serum decrease characterizing a change on the GH/IGF-1 axis. The endotoxemic animals treated with ghrelin showed a smaller reduction of the IGF-1 circulating levels besides presenting a smaller TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitrate levels after receiving the LPS. The smallest IGF-1 circulating decrease, after the treatment with ghrelin, was related neither to the changes on the GHSR-1a or GHR protein expressions nor to the IGF-1 or GHR gene expressions during the analyzed time intervals. Therefore, the ghrelin anti-inflammatory property inflected a reduction of the pro-inflammatory mediators increase and contributed for the GH/IGF-1 axis integrity maintenance while mitigating the IGF-1 blood concentration fall.

Key words: Ghrelin. GH. IGF-1. Endotoxemia. Inflammation. GH/IGF-1 axis.

Lista de abreviaturas e siglas

ALS	Subunidade do ácido lábil
ALT	Transaminase alanina
ARC	Núcleo hipotalâmico arqueado
AST	Transaminase aspartato
cDNA	DNA complementar
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CLP	Ligamento e perfuração do ceco
CVLM	Medula ventrolateral caudal
DMV	Núcleo dorsal motor do vago
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
GH	Hormônio do crescimento
GHR	Receptor do hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GHSR-1a	Receptor do hormônio secretador do hormônio do crescimento
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPA	Eixo hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-1R	Receptor do IGF tipo 1
IGF-2R	Receptor do IGF tipo 2
IGFBP	Proteínas de ligação aos IGF's
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JAK2	Janus Kinase 2
L-NAME	N ^w -nitro-arginina-metil-ester
L-NMMA	NG-metil-L-arginina
LBP	Proteína ligadora do LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Kinase ativadora de mitógeno
mRNA	RNA mensageiro

NE	Noradrenalina
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SOCS	Supressoras da sinalização de citocinas
SS	Somatostatina
STAT	Transdutora de sinal e ativadora de transcrição
TLR-4	Receptor <i>tool-like</i> 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFbp	Proteína ligadora doTNF
VMN	Núcleo hipotalâmico ventromedial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Animais.....	17
3.2 Desenho experimental 1.....	17
3.3 Desenho experimental 2.....	18
3.4 Grupos experimentais.....	18
3.5 Drogas.....	18
3.6 Cirurgia de canulação da veia jugular.....	18
3.7 Coleta de sangue total.....	19
3.8 Quantificação de nitrato por quimioluminescência.....	20
3.9 Quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IGF-1, GH e ghrelina por ELISA..	20
3.10 Quantificação de corticosterona por radioimunoensaio.....	21
3.11 Quantificação da expressão proteica de GHSR-1a e de GHR por <i>Western Blott</i>	22
3.12 Quantificação relativa da expressão gênica de IGF-1 e GHR por PCR-RT.....	23
3.13 Sobrevida.....	24
3.14 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE.....	89

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH) é conhecido por promover o crescimento esquelético e por estimular o anabolismo. Contudo, suas ações vão muito além dessas. Trata-se de um hormônio proteico de 191 aminoácidos e peso molecular de 22kDa sintetizado pelos somatotrofos da hipófise anterior e regulado por diversos fatores. Entre os fatores hormonais que o regula, o hormônio liberador de GH (GHRH) é o mais conhecido. Isolados e caracterizados em 1982, os neurônios que sintetizam GHRH e que estão relacionados à liberação de GH encontram-se nos núcleos hipotalâmicos ventromedial (VMN) e arqueado (ARC) (NUNES, 2015). Esse hormônio liberador promove a síntese e a liberação de GH (AHMED; FARQUHARSON, 2010), enquanto a somatostatina (SS), outro peptídeo envolvido na liberação de GH, suprime a amplitude e a frequência dos pulsos basais de GH e os pulsos estimulados pelo GHRH, mas não compromete a biossíntese do GH pelos somatotrofos (ROZÁRIO; LLOYD; RYAN, 2000). Os neurônios somatostatinérgicos envolvidos na liberação de GH encontram-se nos núcleos hipotalâmicos periventricular, VMN e ARC. Entre os fatores que induzem a síntese e liberação de SS encontram-se o próprio GH, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1 e o GHRH (KHATIB et al., 2014; MURRAY; HIGHAM; CLAYTON, 2015).

No entanto, outros hormônios participam da regulação de síntese, liberação ou inibição do GH. A ghrelina, descoberta há quase duas décadas, é um peptídeo também capaz de induzir a liberação de GH através de diferentes mecanismos: ação direta na hipófise através do receptor do hormônio secretador de GH (GHSR)-1a (KOJIMA et al., 1999; TOLLE et al., 2001); estímulo para liberação de GHRH (DATE et al., 2002; OSTERSTOCK et al., 2010; MURRAY; HIGHAM; CLAYTON, 2015); e antagonização dos efeitos da SS (TANNENBAUM; EPELBAUM; BOWERS, 2003; KHATIB et al., 2014).

As ações do GH ocorrem por ligação ao receptor do hormônio do crescimento (GHR), receptor este que pertence à superfamília classe I dos receptores de citocinas (MOUTOUSSAMI; KELLY; FINIDORI, 1998). A interação entre o GH e o GHR acarreta na associação da janus kinase 2 (JAK2) ao GHR. Após essa associação, a JAK2 se auto-fosforila e também fosforila o próprio GHR. O complexo GHR/JAK2 ativado é capaz de fosforilar as transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STAT) 1, 3,

5a, 5b, os substratos do receptor de insulina (IRS) 1 e 2 e a kinases ativadora de mitógeno (MAPK) (CARTER-SU et al., 1996; CIRILLO et al., 2017). As STATs são proteínas que uma vez fosforiladas, translocam-se para o núcleo, ligam-se ao DNA e promovem efeitos genes específicos, como a síntese de IGF-1 e de proteínas supressoras da sinalização das citocinas (SOCS) (ROZÁRIO; LLOYD; RYAN, 2000). As SOCS fazem parte de uma família de proteínas de 8 membros (SOCS 1-7 e CIS) e são capazes de inibir a ativação das STAT, atuando, portanto, como moduladores dessa via intracelular por meio de um mecanismo de *feedback* negativo (MIHARA et al., 2012; CAROW; ROTTENBERG, 2014).

Muitas das ações conhecidas do hormônio do crescimento, como o crescimento esquelético, são realizadas em conjunto ou como consequência da ação do IGF-1. A síntese e liberação de IGF-1 é regulada principalmente pelo GH e constitui o eixo GH/IGF-1. É importante ressaltar que apesar de pertencer à mesma família do IGF-1, o IGF-2 possui diferentes funções no organismo e não sofre regulação direta pelo GH (ENGUITA-GÉRMAN; FORTES, 2014). À medida em que é produzido, o IGF-1 é prontamente liberado, não sendo, portanto, armazenado em nenhum órgão específico, o que faz com que o sangue seja o local com maior concentração desse peptídeo. Além disso, O IGF-1 não possui um órgão-alvo específico, atuando, assim, em diversos tipos de células do organismo (FRYSTYK, 2004). Apesar de ser produzido pela maioria dos tecidos, a principal fonte de IGF-1 circulante é o fígado (FAN et al., 1995b; ENGUITA-GÉRMAN; FORTES, 2014), e a ativação da via JAK/STAT5b tem um papel importante na produção hepática de IGF-1 (DAVEY et al., 2001).

A maior parte do IGF-1 circulante está ligado às proteínas de ligação aos IGFs (IGFBPs), que compõem um total de seis proteínas. A ligação do IGF-1 às IGFBPs favorece o transporte e regula a biodisponibilidade aos receptores. Quando associado às IGFBPs, acredita-se que o IGF-1 é biologicamente inativo e a sua meia vida é aumentada consideravelmente (FROST; LANG, 2004). A maior parte do IGF-1 presente na circulação encontra-se associado à IGFBP-3 e a uma subunidade do ácido lábil (ASL), formando o complexo ternário de meia vida aproximada de 16h. O tamanho molecular desse complexo não o permite ultrapassar a barreira endotelial facilmente, ficando restrito ao espaço vascular (ROZÁRIO; LLOYD; RYAN et al., 2000; FROST; LANG, 2004; LIVINGSTONE, 2013). Apenas 1% do IGF-1 circula como hormônio livre (AHMED; FARQHARSON, 2010) e as ações biológicas do IGF-1

ocorrem predominantemente através da ligação ao receptor IGF-1R (ENGUITA-GÉRMAN; FORTES, 2014), apesar de também poder se ligar com menor afinidade a outros receptores, como o IGF-2R, receptores de insulina e receptores híbridos tipo-1/insulina (FRYSTYK, 2004).

O IGF-1, assim como o GH, é um hormônio anabólico e ambos já foram utilizados na prática médica para reverter estados patológicos altamente catabólicos. O GH, especialmente, já foi amplamente utilizado como tratamento de pacientes gravemente doentes que apresentavam caquexia (VOERMAN, B. et al., 1992; VOERMAN, J. et al., 1995; JEEVANANDAM et al., 1995). Porém, um ensaio clínico conduzido por Takala et al. (1999) mostrou que o tratamento com altas doses de GH aumentou a mortalidade nos pacientes gravemente doentes. Nos pacientes tratados com GH, houve maior incidência de sepse e ocorreram maior número de óbitos devido ao choque séptico e falência múltipla dos órgãos, levando os autores a sugerir uma ação do GH sobre o sistema imunológico. De fato, o GHR já foi encontrado em células de defesa como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T, e linfócitos B em diferentes espécies, como humanos e ratos (GAGNERAULT; POSTEL-VINAY; DARDENNE, 1996; HATTORI et al., 2001).

Corroborando a hipótese de interação entre o GH e células do sistema imunológico, outros estudos observaram que o tratamento com GH de fato pode ser prejudicial durante situações inflamatórias. Liu et al. (2002) coletaram sangue de ratos *Wistar* submetidos ao ligamento e perfuração do ceco (CLP), um modelo de sepse polimicrobial, e incubaram os neutrófilos com GH. Nesse estudo, os pesquisadores observaram que o tratamento com GH aumentou a oxidação por essas células de defesa. Respostas similares foram encontradas por outros grupos de pesquisadores, os quais observaram que o GH é capaz de aumentar a produção de interleucina (IL)-1- α , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α em monócitos do sangue total de humanos estimulado com lipopolissacarídeo (LPS) (URONEN-HANSSON et al., 2003), bem como aumentar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em monócitos de humanos estimulados com acetato de miristato de forbol (PMA), um composto biologicamente ativo derivado de uma planta (WARWICK-DAVIES; LOWRIE; COLE, 1995). Além do H_2O_2 , outros estudos mostraram que macrófagos de porco (EDWARDS et al., 1988) e de rato (EDWARDS et al., 1992) estimulados com zimozan produziam maiores concentrações de ânion superóxido, outra espécie reativa do oxigênio (ERO), quando incubados com GH. Liao, Rudling e Angelin (1997)

também constataram que ratos submetidos à endotoxemia por LPS tiveram lesões de órgãos mais severas quando co-tratados com GH. No entanto, essa relação ainda é controversa e depende do contexto experimental. Nesse sentido, alguns trabalhos observaram efeitos benéficos do GH durante quadros inflamatórios, com redução de citocinas pró-inflamatórias durante endotoxemia induzida por *E.coli* em ratos, levando ao aumento da sobrevivência dos animais e reduzindo a concentração de bactérias viáveis no sangue, no lavado peritoneal e no fígado (INOUE et al., 1995; HUANG et al., 2002; YI et al., 2007). Já outros pesquisadores não encontraram relação direta entre o tratamento com GH e o aumento de citocinas pró-inflamatórias em camundongos submetidos à CLP (SCHMITZ et al., 2008) ou células mononucleares do sangue periférico de humano estimuladas com LPS e tratadas com GH (ZARKESH-ESFAHANI et al., 2000)

Ao encontro do ensaio clínico conduzido por Takala et al. (1999), outro estudo, realizado com pacientes em diferentes estágios da sepse, observou maiores níveis séricos de GH à medida que aumentava a severidade da doença e, além disso, os níveis séricos desse hormônio estava 7 vezes mais alto nos pacientes que morreram (SCHUETZ et al., 2009). A mesma relação entre o aumento de GH sérico e aumento da mortalidade foi encontrada em estudos clínicos com crianças sépticas (ÖNENLİNGAN et al., 2004; DE GROOF et al., 2002; PAPASTATHI et al., 2013). Nesses estudos, esperava-se que os altos níveis sanguíneos de GH induzissem altos níveis de IGF-1 no sangue, contudo, nas crianças não sobreviventes foram encontrados menores níveis séricos de IGF-1. Recentemente, Xu, L. et al. (2017), apesar de não terem avaliado os níveis séricos de GH, também observou que pacientes sépticos apresentavam cada vez menores níveis circulantes de IGF-1 de acordo com a progressão da doença.

A relação entre maiores níveis sanguíneos de IGF-1 e maior sobrevivência pode ser entendida a partir de estudos em animais, os quais observaram relação inversa entre a carga de bactérias entéricas no plasma e os níveis plasmáticos de IGF-1 em camundongos fêmeas, sugerindo maior preservação da barreira intestinal e da atividade de *clearance* hepática, ambos usualmente comprometidos em quadros altamente inflamatórios (HUNNINGHAKE et al., 2010). De fato, Ashare et al. (2008) relataram que o tratamento com IGF-1 antes, ou mesmo após 12h da inoculação intratraqueal de *P. aeruginosa*, aumentou do *clearance* bacteriano hepático bem como reduziu o aumento de transaminase alanina (ALT), um marcador de lesão hepática,

provocado pela infecção. A melhora do *clearance* bacteriano hepático pode ter ocorrido pela preservação da atividade das células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado) pois outro resultado obtido no estudo mostrou que uma linhagem de células de Kupffer periportais foram protegidas da morte induzida por TNF- α quando pré-incubadas com IGF-1. Ademais, a administração subcutânea de IGF-1 foi capaz de reduzir o aumento plasmático de TNF- α , IL-1 β e IL6 provocado pela infecção intraperitoneal por *E.coli* em camundongos fêmeas (INOUE et al., 1995), assim como a pré-incubação com IGF-1 reduziu a morte de células epiteliais intestinais por apoptose induzida por H₂O₂ (BAREGAMIAN et al., 2006).

No entanto, apesar de muitos estudos clínicos caracterizarem as altas concentrações sanguíneas de GH e baixas concentrações sanguíneas de IGF-1 como sendo a alteração clássica do eixo GH/IGF-1 durante quadros altamente inflamatórios como a sepse, esse importante eixo pode ser alterado de diferentes formas e em diferentes condições inflamatórias. A principal característica da alteração do eixo é a redução na concentração sanguínea de IGF-1, pois a concentração sanguínea de GH apresenta um padrão altamente variável. Estudos realizados com humanos (DAHN; LANGE; JACOBS, 1988; DE GROOF et al., 2002; ÖNELIN-MUNGAN et al., 2004; SCHUETZ et al., 2009; PAPASTATHI et al., 2013) e com ovelhas (BRIARD et al., 2000) responderam às diferentes condições inflamatórias com altos níveis circulantes de GH e diminuição no IGF-1 circulante. Já em estudos que utilizaram ratos, a resposta inflamatória induzida pela endotoxemia ou sepse apresentaram diferentes padrões de resposta, sendo eles o aumento circulante de GH e diminuição de IGF-1 (LANG et al., 1998; YUMET et al., 2002; PRIEGO et al., 2003), a diminuição de GH concomitante à diminuição de IGF-1 (FAN et al., 1994; FAN et al., 1995a; SOTO et al., 1998; LÓPEZ-CALDERÓN; SOTO; MARTÍN, 1999; PRIEGO et al., 2003; PRIEGO et al., 2004;) ou não apresentaram alterações nos níveis circulantes de GH, apenas apresentaram diminuição de IGF-1 circulante (SOTO et al., 1998; DEFALQUE et al., 1999; BALLINGER et al., 2000).

Muitos estudos de inflamação que promovem alteração do eixo GH/IGF-1 utilizam o LPS como agente inflamatório. Trata-se de um componente da parede externa da parede celular de bactérias gram-negativas altamente patogênico. O LPS, quando na corrente sanguínea, liga-se inicialmente a lipoproteínas de alta densidades (HDL). Em seguida, ocorre a síntese hepática da proteína ligadora de LPS (LBP) formando um complexo binário. Esse complexo se associa, então, à proteína

receptora CD14, que se encontra em membranas celulares ou de forma solúvel no plasma. Forma-se, portanto, um complexo ternário capaz de se ligar ao receptor toll-like (TLR)-4 (DAUPHINEE; KARSAN, 2006). A ativação do TLR-4 resulta, entre outras respostas, na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que por sua vez induz a síntese gênica de proteínas de fase aguda, citocinas, fatores de coagulação e enzimas. Como consequência, o LPS leva ao aumento da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e óxido nítrico (NO) (JEAN-BAPTISTE, 2007; NDUKA; PARRILLO, 2011).

Apesar de ainda não ser completamente entendido, os mediadores pró-inflamatórios são apontados como possíveis causadores do rompimento do eixo GH/IGF-1 durante a inflamação. Nesse contexto, o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e o NO possuem um papel relevante. Esses mediadores atuam na modulação da sinalização da via JAK/STAT5, bem como na expressão gênica e na síntese de IGF-1, IGFBP's e SOCS (FAN et al., 1995a; SAMSTEIN et al., 1996; FAN et al., 1996; WOLF et al., 1996; THISSEN; VERNIERS 1997; LANG et al., 1998; BOISCLAIR et al., 2000; COLSON et al., 2000; WANG, P. et al., 2002; WANG, LI; LI., 2002; YUMET et al., 2002; DENSON et al., 2003; SHUMATE et al., 2005; AHMED et al., 2006; AHMED et al., 2007).

Ao se estudar o eixo GH/IGF-1 e as possíveis condições inflamatórias que alteram esse eixo, torna-se relevante investigar a participação da ghrelina, um hormônio com propriedades anti-inflamatórias. Conhecido principalmente por sua capacidade de liberar GH (KOJIMA et al., 1999; TOLLE et al., 2001; TANNENBAUM; EPELBAUM; BOWERS, 2003;) e por seu efeito orexigênico (WREN et al., 2000; DATE et al., 2002), a ghrelina é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos cuja serina na posição três sofre modificação pelo ácido n-octanóico, tornando-se acilada. Essa modificação é essencial para que ocorra efeitos biológicos como a liberação do GH via GHSR-1a (KOJIMA et al., 1999). A acilação é realizada por uma lipídio transferase denominada *ghrelin O-acyl transferase* (GOAT) (YANG, J. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2008). Apesar de ser produzida por diferentes células do organismo, a maior produção de ghrelina encontra-se no trato gastrointestinal. Neste, o estômago é o principal local de produção, sendo as células *x/a like* responsáveis por sua síntese. Essas células correspondem a cerca de 20% das células endócrinas da glândula oxíntica, com predominância no fundo do estômago (DATE et al., 2000a; DORNONVILLE DE LA COUR et al., 2001; SAKATA et al., 2002;). A ghrelina do rato difere da ghrelina humana em apenas dois aminoácidos (KOJIMA et al., 1999) e

atravessa a barreira hemato-encefálica de camundongos em ambos os sentidos, sendo predominante o sentido cérebro->corpo (BANKS et al., 2002).

Os efeitos anti-inflamatórios da ghrelina já foram observados em diferentes modelos de inflamação como colite (GONZALEZ-REY; CHORNY; DELGADO, 2006; MADUZIA et al., 2015), doença gordurosa hepática não alcoólica (LI, Y. et al., 2013; MAO et al., 2015a), hepatite (MAO et al., 2015b), lesão cerebral (CHEYUO et al., 2011; SUN et al., 2016) e sepse polimicrobial (WU et al., 2005; WU et al., 2007a; WU et al., 2007b; WU et al., 2009a; WU et al., 2009b; ZENG et al., 2015; WEI et al., 2015; KHOWAILED et al., 2015; SIEGL et al., 2015). Nos estudos, sua capacidade anti-inflamatória é evidenciada em diferentes células e tecidos pela redução de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (DIXIT et al., 2004; GONZALEZ-REY; CHORNY; DELGADO, 2006; WU et al., 2007a; WU et al., 2007b; WU et al., 2007c; WASEEM et al., 2008; WU et al., 2008; CHEYUO et al., 2011; KHOWAILED et al., 2015; SIEGL et al., 2015; WEI et al., 2015; SUN et al., 2016; ROCHA et al., 2017) redução de morte celular por apoptose (WANG, G. et al., 2011; CHEYUO et al., 2011; LI, Y. et al., 2013; LI, B. et al., 2015; WEI et al., 2015; MAO et al., 2015b; SUN et al., 2016; WANG, Q. et al., 2017), redução de marcadores de lesão tecidual como AST, ALT e lactato (WU et al., 2007a; WU et al., 2008; RAJAN et al., 2012; LI, Y. et al., 2013; MAO et al., 2015a; MAO et al., 2015b; WANG, Q. et al., 2017), redução do acúmulo de células de defesa no sítio inflamatório (GONZALEZ-REY; CHORNY; DELGADO, 2006; WU et al., 2007b; WU et al., 2008; CHEYUO et al., 2011; RAJAN et al., 2012; LI, B et al., 2015; ROCHA et al., 2017), diminuição da área tecidual necrosada (GONZALEZ-REY, CHORNY; DELGADO, 2006; REZAEIAN et al., 2012; LI, Y. et al., 2013; MAO et al., 2015b) diminuição da translocação de bactérias (WU et al., 2007b; WU et al., 2009a), redução de endotelina-1 (WU et al., 2005), redução de *high mobility group box one* (HMGB-1) (WU et al., 2009a; CHORNY et al., 2008), redução de danos causados por estresse oxidativo (WANG, Q. et al., 2017) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (GONZALEZ-REY; CHORNY; DELGADO, 2006; PRENZLER et al., 2007; WASEEM et al., 2008; ROCHA et al., 2017). Alguns desses estudos realizaram, também, vagotomia e verificaram inibição da capacidade anti-inflamatória da ghrelina, evidenciando a importância da sinalização vagal nesse processo (WU et al., 2007a; WU et al., 2008; WU et al., 2009a; CHEYUO et al., 2011; RAJAN et al., 2012; KHOWAILED et al., 2015). Além da ativação vagal, a redução da atividade simpática proporcionada pelo tratamento com ghrelina (MATSUMURA et al., 2002; LIN et al.,

2004; MANO-OTAGIRE et al., 2009; CALLAGHAN et al., 2012; SCHWENK et al., 2012; SOEKI et al., 2013; MAO et al., 2013) pode ser outro mecanismo de redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. A maior atividade do sistema nervoso simpático e o subsequente aumento de noradrenalina (NE) circulante característicos de quadros altamente inflamatórios resultam na ativação de receptores adrenérgicos α -2, que por sua vez estão relacionados ao aumento de TNF- α (SZELENYI; KISS; VIZI, 2000; YANG, S. et al., 2000; YANG, S. et al., 2001; MIKSA et al., 2005). Portanto, esse pode ser mais um mecanismo que confere à ghrelina propriedades anti-inflamatórias.

Nesse sentido, a hipótese desse estudo foi de que a administração de ghrelina sistemicamente pudesse atenuar a inflamação provocada pela administração de LPS nos ratos, favorecendo a integridade do eixo GH/IGF-1 e, conseqüentemente, contribuir para a manutenção dos níveis fisiológicos de IGF-1 circulante (figura 1).

Figura 1. Hipótese: A ghrelina reduz a síntese de mediadores pró-inflamatórios, o que favorece a manutenção de níveis adequados de GHR hepático, que por sua vez mantém a síntese e liberação de IGF-1, contribuindo para a integridade do eixo GH/IGF-1.

OBJETIVOS

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório da ghrelina sobre o eixo GH/IGF-1 em animais normais e animais submetidos à endotoxemia

2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da administração de ghrelina *per se* sobre as concentrações circulantes de TNF- α , IL-1 β , IL-6, nitrato, corticosterona, GH, IGF-1 e ghrelina em animais controles;
- b) Avaliar o efeito do tratamento com ghrelina sobre as concentrações circulantes de TNF- α , IL-1 β , IL-6, nitrato, corticosterona, GH, IGF-1 e ghrelina em animais endotoxêmicos;
- c) Avaliar o efeito da administração de ghrelina *per se* sobre as concentrações hepáticas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 em animais controles;
- d) Avaliar o efeito do tratamento com ghrelina sobre as concentrações hepáticas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 em animais endotoxêmicos;
- e) Avaliar o efeito da administração de ghrelina *per se* sobre a expressão proteica hepática de GHSR-1a e GHR em animais controles;
- f) Avaliar o efeito do tratamento com ghrelina sobre a expressão proteica hepática de GHSR-1a e GHR em animais endotoxêmicos;
- g) Avaliar o efeito da administração de ghrelina *per se* sobre a expressão gênica hepática de IGF-1 e GHR em animais controles;
- h) Avaliar o efeito do tratamento com ghrelina sobre a expressão gênica hepática de IGF-1 e GHR em animais endotoxêmicos;
- i) Avaliar o efeito do tratamento com ghrelina na sobrevida de animais submetidos à endotoxemia.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos *Wistar*, pesando entre 250-300g (50-70 dias de vida), provenientes do Biotério Central do Campus da USP- Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampa aramada com dimensão de 180mm de altura x 410mm de largura, sendo alocados 3 animais por caixa. As caixas foram acondicionadas em estante ventilada (Alesco Ind. E Comércio Ltda, Monte Mor, SP, Brasil) com temperatura controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h. Foi permitido livre acesso à água e à dieta comercial balanceada

Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pela Comissão de Ética no Uso em Animais Experimentação Animal do *campus* de Ribeirão Preto-USP (protocolo nº 14.1.912.53.6).

3.2 Desenho experimental 1

Figura 2. Desenho experimental 1: Foi realizado canulação da veia jugular direita dos animais pela manhã. Na manhã do dia seguinte foi iniciado o experimento (tempo zero) com a administração de LPS e/ou ghrelina. Os animais tiveram o sangue e o fígado coletados no intervalo de 2 horas, 6 horas e 12 horas.

3.3 Desenho experimental 2

Figura 3. Desenho experimental 2: Foi realizada canulação da veia jugular direita dos animais pela manhã. Na manhã do dia seguinte foi iniciado o experimento (tempo zero) com a administração de LPS e/ou ghrelina. Os animais foram observados por 72 horas para a realização do estudo de sobrevida.

3.4 Grupos experimentais

	Grupo Controle	Grupo Ghrelina (ghrelina per se)	Grupo LPS	Grupo Ghrelina + LPS
ev	Salina estéril (NaCl 0,9%)	Ghrelina (15nmol/kg)	Salina estéril (NaCl 0,9%)	Ghrelina (15nmol/kg)
ip	Salina estéril (NaCl 0,9%)	Salina estéril (NaCl 0,9%)	LPS (5mg/kg)	LPS (5mg/kg)

Figura 4. Grupos experimentais. O estudo foi realizado utilizando-se 4 grupos experimentais. ev: endovenoso. ip: intraperitoneal.

3.5 Drogas

Para os experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*- sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); ghrelina de rato (Tocris Bioscience, Bristol, UK).

3.6 Cirurgia de canulação da veia jugular

No dia anterior ao experimento, os animais tiveram a veia jugular externa direita canulada para injeções intravenosas. Para este procedimento, foram utilizadas cânulas de tubos de silicone (Silastic®, Dow Corning CO, Midland, MI, EUA) com

comprimento total de 11 cm, onde apenas 1,7 cm progredia em direção ao átrio direito. A cirurgia foi realizada sob anestesia geral com ketamina (75mg/kg, ip) e xilasina (10mg/kg, ip). Após tricotomia da região supra-clavicular direita e cervical dorsal, o animal foi fixado na mesa cirúrgica e a veia jugular identificada por transparência. Em seguida, foi realizada uma incisão paralela ao trajeto venoso, de modo que foi obtido acesso para dissecação da veia. A veia jugular foi exposta e uma pequena incisão foi realizada na parede superior da mesma. Por esta incisão, a cânula foi introduzida dentro da veia cava superior e o retorno venoso através da cânula confirmado. A cânula foi então fixada no local por ligaduras com fio de algodão embebido em álcool iodado. Após este procedimento, a cânula foi lavada e preenchida com solução salina livre de pirógenos para evitar obstrução da cânula por coágulo. A oclusão da cânula foi realizada através de um laço, feito com auxílio de uma pinça cirúrgica. A extremidade livre da cânula foi exteriorizada na região cervical dorsal através de um trajeto subcutâneo com auxílio de um trocater. No local da incisão cirúrgica, os planos foram suturados em bloco com pontos simples, utilizando-se fios de algodão. Após a cirurgia, os animais foram transferidos para a estante ventilada e foram mantidos sem manipulação até o início da sessão experimental na manhã seguinte, com livre acesso a água e ração.

3.7 Coleta de sangue total

A coleta do sangue e do fígado nos diferentes intervalos de tempo (2h, 6h e 12h) foram realizadas em diferentes animais do grupo experimental em questão. Portanto, os resultados obtidos nesses diferentes intervalos de tempo não se referem ao mesmo animal, mas em pares que pertencem ao mesmo grupo experimental.

Para as dosagens sanguíneas e para as coletas de tecido hepático, os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue do tronco foi coletado em tubos falcon, e estes mantidos em gelo até o momento da centrifugação. Para obtenção do plasma, foi utilizado o anticoagulante K₃EDTA na concentração final de 1,735 mg/mL de sangue. Para a obtenção do soro, foi permitido ao sangue coagular por 40 minutos. O plasma ou o soro foram distribuídos em alíquotas para futuras dosagens.

O tecido hepático foi coletado, separado alíquotas e imediatamente congelado em gelo seco ou nitrogênio líquido, dependendo do experimento em questão. Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer a -80°C até posteriores dosagens.

3.8 Quantificação de nitrato por quimioluminescência

A concentração plasmática de NO foi quantificada a partir da concentração de nitrato (produto mais estável e proveniente da oxidação do NO). Inicialmente, 50µl de plasma foi desproteínizado por incubação com 100µl de etanol 95% a 4°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rotações/minuto e o sobrenadante utilizado para a dosagem.

Foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/Ozônio (HAMPL, 1996). A dosagem de nitrato foi realizada usando 5µl de amostra injetada em um vaso de reação contendo um agente redutor (0.8% de cloreto de vanádio em 1N de HCL à 95°C) que converte nitrato em NO em quantidades equimolares. O NO é carregado para a câmara de quimioluminescência do Sievers NOanalisar utilizando gás hélio (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA).

A detecção do NO decorre de sua reação com ozônio, emitindo luz vermelha. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente gerada é convertida por um conversor analógico-digital e analisada em um computador. A área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato da amostra. Os resultados gerados foram expressos por micro mol por litro (µM).

3.9 Quantificação de TNF-α, IL-1β, IL-6, IGF-1, GH e Ghrelina por ELISA

Para a dosagem sanguínea e hepática de TNF-α, IL-1β, IL-6, assim como para dosagem sanguínea de IGF-1, GH e Ghrelina, foram utilizados kits comerciais de ELISA (do inglês, “*enzyme-linked immunoabsorbent assay*”). Os kits de ELISA para quantificação de TNF-α, IL-1β, IL6, IGF-1 foram obtidos da R&D systems (Minneapolis, MN EUA), enquanto os kits de ELISA para quantificação de GH e ghrelina foram obtidos da EMD Millipore (Missouri, MO, EUA). Para a dosagem

sanguínea do TNF- α , IL-1 β , IL-6, IGF-1 e GH, os animais tiveram o sangue coletado nos horários pré-estabelecidos e, então, obtido o soro. Para obtenção do soro, foi permitido ao sangue a coagulação por 40 minutos em gelo. Para a dosagem sanguínea de ghrelina, os animais tiveram o sangue coletado nos horários pré-estabelecidos e, então, obtido o plasma. Para obtenção do plasma (dosagem de ghrelina), foi utilizado o anticoagulante K₃EDTA na concentração final de 1,735 mg/mL. Ao sangue, foi adicionado o inibidor de proteases Pefabloc (Sigma-Aldrich, Darmstadt, ALE) na concentração de 1mg/mL de sangue. Após centrifugação, o plasma foi separado e acidificado com HCL na concentração final de 0,05N, conforme orientações do fabricante. Os resultados obtidos do sangue foram expressos por pg/mL.

Para a dosagem hepática de TNF α , IL-1 β e IL-6, os animais tiveram o fígado coletado nos horários pré-estabelecidos e congelados imediatamente em gelo seco. Posteriormente, o tecido foi homogeneizado na presença de tampão PBS (0,14M de NaCl, 10mM de KCl, 6,75mM de Na₂HPO₄.12H₂O e 1,14Mm de K₂HPO₄) e a quantificação da proteína tecidual foi realizada pelo método de Lowry (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA). O sobrenadante foi armazenado em diferentes alíquotas para posterior dosagem pelos kits de ELISA específicos. Os resultados obtidos nos tecidos foram expressos em pg/g de proteína.

3.10 Quantificação de corticosterona por radioimunoensaio

A quantificação de corticosterona foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIE) no laboratório dos professores Dr. José Antunes-Rodrigues e Dra. Lucila Leico Kagohara Elias. O RIE foi conduzido de acordo com Haack et al. (1979) e Castro, Figueiredo e Moreira et al. (1995). Para a quantificação da corticosterona, foi utilizado o plasma. A obtenção do plasma foi realizada com K₃EDTA na concentração final de 1,735 mg/mL.

A extração do hormônio foi realizada com 1mL de etanol (4°C) para 25 μ L de plasma e subsequentemente centrifugado (2500 rpm, 15 min, 4°C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e liofilizado. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspenso em tampão do ensaio e pipetado.

Todas as amostras para a dosagem do esteroide foram realizadas no mesmo experimento, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio de 5,93% e a sensibilidade do ensaio foi de 7,8 pg/mL. Os resultados obtidos no plasma foram expressos em pg/mL.

3.11 Quantificação da expressão proteica de GHSR-1a e de GHR por *Western Blott*

A quantificação da expressão proteica de GHSR-1a e de GHR foi realizada por meio técnica de *Western Blott* no laboratório da prof^a Dr^a Angelita Maria Stabile. Previamente ao Western Blot, o fígado foi homogeneizado em tampão RIPA (50mM de Tris, 150mM de NaCl e 1mM de EDTA) acrescido do coquetel de inibidores de protease (Amresco, Fountain Parkway Solon, OH, USA). Em seguida foi realizada quantificação de proteínas no fígado pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA). Amostras com 30µg de proteína foram misturadas ao tampão de amostra (1,25M de Tris, pH 6,8; 2% de SDS; 0,01% de bromofenol azul; 10 % de glicerol e 250 mM de 2-ME) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE em gel de bis-acrilamida com gradiente de 10 %, em tampão contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS, pH 8,3. As proteínas que migraram no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, ON, Canadá) por eletrotransferência molhada (15 mM de Tris, 120 mM de glicina, 20% metanol, pH 8,3). Após a transferência, os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com tampão TBS-T (20 mM Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) acrescido de 5% de leite desnatado por 1 hora a temperatura ambiente, em agitação constante. Após lavagem da solução de bloqueio com TBS-T, as membranas foram incubadas overnight a 4°C, com um dos anticorpos primários diluídos 1:1.000: Anti-GHR (ab190927, Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-GHSR-1a (sc-10359, Santa Cruz Biotechnology, Downtown, TX, EUA) e anti-β actina (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) em solução TBS-T acrescido de albumina bovina 3%. As membranas foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com TBS-T antes da adição do segundo anticorpo conjugados à peroxidase diluído 1:5.000 em TBS-T acrescido de 5% de leite desnatado por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com TBS-T e, então, adicionado o melhorador de

quimioluminescência (ECL) e o filme exposto. Para a reutilização da membrana, os anticorpos foram removidos por imersão das membranas em tampão de remoção (*stripping*; 0,2M glicina, 3,4mM de SDS, 1% de Tween® 20 e pH de 2,2).

As bandas foram quantificadas por meio do programa ImageJ, disponível para download gratuito no endereço <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> (Acessado em: 13/03/2018). As bandas das proteínas de interesse (GHSR-1a e GHR) foram normalizadas pela actina, o controle endógeno.

3.12 Quantificação relativa da expressão gênica de IGF-1 e GHR por PCR-RT

Para a quantificação da expressão gênica de IGF-1 e GHR hepáticos, foi utilizado a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real no laboratório do prof. Dr. Riccardo Lacchini. Após a remoção do fígado, uma amostra do órgão foi colocada em tubos de microcentrifuga (Eppendorf®) livres de RNase e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo, então, estocado em freezer -80°C para futuras dosagens. Para a extração do RNA total, o material foi desintegrado em homogeneizador de vidro em presença de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com estrito controle da temperatura (em gelo). O RNA foi extraído segundo instruções do fabricante do Trizol. O RNA foi quantificado por espectrofotometria usando o equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Todas as amostras tiveram uma razão das absorbâncias a 260/280 nanômetros acima de 1,8. Além disso, foi realizado uma eletroforese em agarose (1,2% peso/volume) e as bandas do RNA ribossomal 28S e 18S foram avaliadas qualitativamente. A presença de DNA genômico também foi analisada no mesmo experimento. Duas amostras foram excluídas por apresentarem visível degradação das bandas de RNA ribossomal. O cDNA foi obtido a partir do RNA pela reação da enzima transcriptase reversa, acoplada à reação de DNase para remoção do DNA genômico contaminante. Para esse processo, foi utilizado o kit High Capacity cDNA RT (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) com inibidor de RNase e o kit DNase (Sigma-Aldrich, Darmstadt, ALE). Para a análise quantitativa dos seguintes genes de interesse: IGF-1 (Rn00710306_m1) e GHR (Rn00567298_m1), foram utilizados ensaios comerciais de expressão gênica TaqMan® (concentração final 1x), e o kit JumpStart Ready Mix for Quantitative PCR (concentração final 1x; Sigma-Aldrich, Darmstadt, ALE). Os cDNAs

usados nas reações de qPCR foram diluídos 2,5x. As reações foram realizadas em triplicatas e analisadas com o equipamento StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied biosystems) e seu respectivo software. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o método do Pfaffl, M.W. O gene do GAPDH (Rn01775763_g1) foi utilizado como controle endógeno.

3.13 Sobrevida

Para a realização do experimento de sobrevida, os animais foram mantidos isolados em caixas plásticas após o início do experimento. Foi permitido livre acesso à água e ração. Os animais foram observados por 72 horas. Ao final do experimento, foram eutanasiados com sobredose anestésica de pentobarbital (150mg/kg, ip. Dose de 30mg/mL). Ao pentobarbital foi adicionada lidocaína na concentração de 10mg/mL, de acordo com resolução normativa nº13 do CONCEA e conforme aprovado pelo comitê de ética.

3.14 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Para análise estatística dos resultados, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Análise de variância para medidas repetidas (one-way ANOVA e two-way ANOVA) e teste *post hoc* Tukey's. No estudo de sobrevida, a análise foi estimada pelo método de Kaplan-Meier e comparada pelo teste de log-rank. A análise estatística foi calculada pelo programa Graphpad Prism 4. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Administração de ghrelina reduziu o aumento sérico de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e nitrato nos animais submetidos à endotoxemia.

Para a dosagem dos níveis circulantes de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e nitrato, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o sangue coletado. A administração de ghrelina *per se* não alterou as concentrações séricas de nenhum dos mediadores pró-inflamatórios avaliados. Em contrapartida, a administração de LPS elevou os valores séricos de TNF- α em todos os horários avaliados (figura 4B-D). Nos animais endotoxêmicos, o tratamento com ghrelina reduziu o pico de TNF- α observado no soro no intervalo de 2h (figura 4B), sem alterar as concentrações séricas nos intervalos seguintes (figura 4C-D). A administração de LPS aumentou os níveis séricos de IL-1 β e IL-6 (figuras 5B-D e 6B-D respectivamente) em todos os intervalos analisados. O tratamento com ghrelina atenuou o aumento de IL-1 β e IL-6, induzidos pelo LPS, apenas em 12h (figuras 5D e 6D, respectivamente). Após administração de LPS, os níveis de nitrato, um marcador indireto da produção de NO, se elevou em todos os horários analisados (figura 7B-D). O tratamento com ghrelina reduziu as concentrações plasmáticas de nitrato apenas em 12h (figura 7D), horário em que o nitrato se encontrava bastante elevado nos animais que receberam LPS.

Figura 4. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração sérica de TNF- α em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 6 a 10 animais.

Figura 5. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração sérica de IL-1 β em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 6 a 10 animais.

Figura 6. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração sérica de IL-6 em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 6 a 10 animais.

Figura 7. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração plasmática de nitrato em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 7 a 10 animais.

Administração de ghrelina reduziu o aumento hepático de TNF- α , IL-1 β e IL-6 nos animais submetidos à endotoxemia.

Para a dosagem dos níveis hepáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o fígado coletado. A administração de ghrelina *per se* não alterou as concentrações hepáticas de nenhuma das citocinas avaliadas. A administração de LPS elevou a concentração hepática de TNF- α apenas no intervalo de 2h e o tratamento com ghrelina reduziu esse aumento (figura 8B). Os níveis hepáticos de IL-1 β e IL-6 se elevaram após administração de LPS em todos intervalos analisados (figuras 9B-D e 10B-D). O tratamento com ghrelina atenuou esse aumento em 2h e 12h (figuras 9B e D; 10B e D, respectivamente).

Figura 8. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração hepática de TNF- α em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 6 a 10 animais.

Figura 9. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração hepática de IL-1 β em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 7 a 10 animais.

Figura 10. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração hepática de IL-6 em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 7 a 11 animais.

Administração de ghrelina per se eleva a concentração plasmática de corticosterona, porém, o tratamento com ghrelina não altera a resposta dos animais submetidos à endotoxemia.

Para a dosagem da concentração plasmática de corticosterona, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o plasma coletado. A administração de ghrelina *per se* elevou a concentração plasmática de corticosterona apenas no intervalo de 12h (figura 11D). Os ratos endotoxêmicos apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona em todos os intervalos analisados (figura 11B-D), sendo que o tratamento com ghrelina não alterou essa resposta.

Figura 11. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração plasmática de corticosterona em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 4 a 6 animais.

Administração de ghrelina per se altera os níveis circulantes de GH, IGF-1 e ghrelina.

Para a dosagem dos níveis circulantes de GH, IGF-1 e ghrelina, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o sangue coletado. A administração de ghrelina *per se* aumentou os níveis plasmáticos da ghrelina endógena em 2h e 6h e reduziu em 12h (figura 12B-D). O aumento na concentração plasmática de ghrelina em 2h (figura 12B) foi acompanhado da redução na concentração sérica de IGF-1 nesses animais (fig. 12B). No entanto, nos intervalos posteriores (6h e 12h), a concentração sérica de IGF-1 permaneceu semelhante à concentração dos animais controle salina (figura 13C e D). A administração de ghrelina *per se* diminuiu os níveis séricos de GH em 12h (figura 14D).

Figura 12. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração plasmática de ghrelina em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 6 a 10 animais.

Figura 13. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração sérica de IGF-1 em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 7 a 10 animais.

Figura 14. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a concentração sérica de GH em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 6 a 10 animais.

O tratamento com ghrelina atenua as alterações dos níveis circulantes de GH, IGF-1 e ghrelina presente nos animais submetidos à endotoxemia.

Para a dosagem dos níveis circulantes de GH, IGF-1 e ghrelina, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o sangue coletado. A administração de LPS reduziu os níveis plasmáticos de ghrelina em 6h de tal forma que não foi possível ser detectado pelo kit de ELISA (figura 12C). Em 12h, os níveis de ghrelina foram detectados pelo kit de ELISA, porém, ainda se encontravam reduzidos em relação ao grupo controle (figura 12D). O LPS reduziu a concentração sérica de IGF-1 em todos os horários analisados (figura 13 B-D) e o tratamento com ghrelina atenuou a redução observada em 12h (figura 13D). A redução do GH sérico induzida pelo LPS foi observada em todos os horários analisados (figura 14B-D) e o tratamento com ghrelina preveniu a queda apenas no intervalo de 2h (figura 14B).

A expressão proteica hepática do GHSR-1a é alterada nos animais endotoxêmicos, enquanto a expressão proteica hepática do GHR não é alterada nos animais submetidos à endotoxemia.

Para a dosagem da expressão proteica de GHSR-1a e do GHR, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o fígado coletado. A administração de LPS *per se* aumentou a expressão proteica do GHSR-1a apenas no intervalo de 2h (figura 15B). No entanto, no grupo dos animais que receberam LPS e foram tratados com ghrelina, esse aumento foi observado tanto no intervalo de 2h como no intervalo de 6h (figura 15B e C, respectivamente). Já em relação à expressão proteica de GHR, não foi observada nenhuma alteração na expressão proteica em nenhum grupo e em nenhum intervalo analisado dos nossos experimentos (figura 16B-D).

Figura 15. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a expressão proteica de GHSR-1a em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 4 a 7 animais.

Figura 16. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a expressão proteica de GHR em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 3 a 6 animais.

O tratamento com ghrelina não altera a expressão gênica de IGF-1 e de GHR dos animais submetidos à endotoxemia.

Para a dosagem da expressão gênica de IGF-1 e do GHR, os animais foram sacrificados em 2h, 6h e 12h e tiveram o fígado coletado. A administração de LPS reduziu a expressão gênica de IGF-1 nos intervalos de 6h e 12h (figuras 17C e D) e o tratamento com ghrelina não alterou essa resposta. Nos animais endotoxêmicos, foi observada redução significativa da expressão gênica de GHR apenas no intervalo de 6h (figuras 18C) e o tratamento com ghrelina também não alterou essa resposta.

Figura 17. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a expressão gênica de IGF-1 em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 5 a 8 animais.

Figura 18. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a expressão gênica de GHR em ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.). A: Intervalos agrupados para avaliação de interação no tempo e/ou no tratamento. B: intervalo de 2h. C: intervalo de 6h. D: intervalo de 12h. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Número de animais por grupo: 5 a 8 animais.

A sobrevivência não foi alterada no modelo de endotoxemia

Para análise de sobrevivência, os animais foram observados por 72h. A administração de LPS aumentou a mortalidade em 10%, porém, sem apresentar diferença significativa em relação ao grupo controle. Nenhum animal submetido à endotoxemia e tratado com ghrelina morreu durante o experimento (figura. 19).

Figura 19. Efeito da administração de ghrelina (15nmol/kg, e.v.) sobre a sobrevida de ratos submetidos à endotoxemia (LPS 5mg/kg, i.p.) por 72h. Valores expressos em porcentagem. Em parêntesis: número de animais por grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As alterações promovidas no eixo GH/IGF-1 em modelos inflamatórias vêm sendo estudadas há algumas décadas. Contudo, esse estudo foi o primeiro a avaliar o efeito anti-inflamatório da ghrelina sobre as alterações nesse eixo durante a endotoxemia. Nesse contexto, o tratamento com ghrelina foi capaz de atenuar a queda característica de IGF-1 circulante, sugerindo maior integridade do eixo GH/IGF-1.

A ghrelina é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos produzido principalmente pelas células X/A-like do estômago (KOJIMA; KANGAWA, 2005). Trata-se de um hormônio conhecido por causar liberação de GH (KOJIMA et al., 1999; TOLLE et al., 2001; TANNENBAUM; EPELBAUM; BOWERS, 2003) e por ter efeito orexigênico (WREN et al., 2000; DATE et al., 2002). Possui meia-vida de aproximadamente 30 minutos no rato (TOLLE et al., 2002) e 10 minutos no homem (NAGAYA et al., 2001). Suas ações bioativas são atribuídas à interação com o receptor GHSR-1a (KOJIMA et al., 1999), um receptor com sete domínios transmembrana e acoplado à proteína G α (HOWARD et al., 1996). No modelo experimental utilizado no presente estudo, após 2h da administração de ghrelina *per se* em *bolus*, os níveis plasmáticos desse hormônio ainda estavam altos. Porém no intervalo de 12h, a concentração plasmática estava menor que a do grupo controle. Nossos dados estão de acordo com o observado por Tolle et al. (2002). Esses pesquisadores observaram que administração de ghrelina em *bolus* endovenoso elevou a ingesta alimentar rapidamente, porém, após 9 horas do *bolus*, a quantidade total de alimento consumido durante as 9 horas seguidas foi semelhante à dos ratos controles. Tal resultado sugere um efeito compensatório, em que a elevada ingesta alimentar é seguida da diminuição posterior da mesma. Apesar dos autores não terem avaliado os níveis plasmáticos de ghrelina tardiamente, acredita-se que os níveis de ghrelina poderiam estar reduzidos nesse momento.

A elevada ingesta alimentar tem como consequência o aumento de proteínas e ácidos graxos no intestino, bem como a liberação de hormônios gastrointestinais como a somatostatina e o hormônio liberador de gastrina. Todos esses fatores são capazes de inibir a liberação de ghrelina, diminuindo sua concentração plasmática (WILLIAMS et al., 2003; DE LA COUR; NORLÉN; HAKANSON, 2007; FOSTER-SCHUBERT et al., 2008). Além dos fatores relacionados à digestão alimentar, a

diminuição da atividade simpática é outro mecanismo capaz de reduzir a liberação de ghrelina, uma vez que a ativação de receptores adrenérgicos β -1 presentes em células produtoras de ghrelina estimulam a liberação do peptídeo (ENGELSTOFT et al., 2013; MÜLLER et al., 2015). De fato, trabalhos na literatura mostraram que a administração de ghrelina exógena foi capaz de reduzir a atividade simpática renal (LIN et al., 2004), esplênica (CALLAGHAN et al., 2012) e cardíaca de ratos (FREEMAN et al., 2013), assim como foi capaz de diminuir a liberação de noradrenalina no tecido adiposo marrom também de ratos (MANO-OTAGIRE et al., 2009). Em situações patológicas, como no infarto do miocárdio, situação em que ocorre aumento da atividade simpática cardíaca, o tratamento com ghrelina também atenuou o aumento dessa atividade autônoma em camundongos (MAO et al., 2013) e em ratos (SCHWENK et al., 2012). Corroborando esses experimentos, o GHSR-1a já foi encontrado em neurônios simpáticos pré-ganglionares (FERENS et al., 2010; CALLAGHAN et al., 2012), no núcleo do trato solitário (NTS) e na medula ventrolateral caudal (CVLM) (LIN et al., 2004), importantes locais que participam do controle da atividade nervosa simpática. Porém, para determinar se a diminuição da concentração plasmática de ghrelina endógena foi resultado de um aumento inicial da ingesta alimentar e/ou diminuição da atividade simpática dos animais após administração exógena de ghrelina *per se*, outros experimentos precisam ser realizados.

Já nos animais que foram tratados com LPS, nossos resultados mostraram diminuição nos níveis plasmáticos de ghrelina em 6h de tal forma que não foi detectável pelo método utilizado. A concentração de ghrelina circulante durante a endotoxemia ou peritonite polimicrobial parece ser dependente da espécie. Nessas condições, observa-se aumento na ghrelina circulante em cães (YILMAZ; ILCOL; ULUS, 2008), uma resposta bifásica no humano - aumento inicial seguido de queda nos valores plasmáticos (VILA et al., 2007; VILA et al., 2009), e diminuição dos níveis circulantes em ratos (BASA et al., 2003; WU et al., 2004; WU et al., 2009b). A diminuição da ghrelina circulante nos ratos pode ser consequência do aumento sistêmico de IL-1 β , uma vez que a estimulação de células do núcleo pulposo de humanos (células produtoras de ghrelina) com essa citocina levou à redução de mRNA de ghrelina (LI, W. et al., 2017). Resultado similar também foi encontrado em células obtidas de grelioma gástrico, denominadas MGN3-1 (IWAKURA et al., 2017). Nesse estudo, a estimulação com IL-1 β ao meio de cultura também reduziu a expressão gênica de ghrelina, confirmando o caráter inibitório dessa citocina sobre a

síntese do hormônio. Além da IL-1 β , o aumento de lactato, presente na endotoxemia (CHANG et al., 2003b; SAIA et al., 2013), pode ser outro mecanismo pelo qual ocorre redução dos níveis plasmático de ghrelina, pois em culturas de células primárias da mucosa gástrica, o tratamento com lactato reduziu a secreção de ghrelina por interagir com o receptor acoplado à proteína Gi GRP81 (ENGELSTOFT et al., 2013). No nosso modelo de endotoxemia, o tratamento com ghrelina, no entanto, atenuou essa diminuição observada nos animais endotoxêmicos, possivelmente, por atenuar o quadro altamente inflamatório provocado pela administração de LPS.

O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, que após interagir com receptores de reconhecimento de padrões, inicia a resposta inflamatória de defesa (NDUKA; PARRILLO, 2011). A ligação do LPS ao LBP e à molécula receptora CD-14 forma um complexo ternário capaz de se ligar ao receptor TLR4/MD2, culminando na translocação do NF- κ B ao núcleo, onde promove a transcrição de diversos genes. Como resultado da transcrição genica promovida pelo NF- κ B, podemos destacar as proteínas de fase aguda, as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), esta responsável por produzir NO (NDUKA; PARRILLO, 2011). O próprio TNF- α e a IL-1 β também levam à ativação do NF- κ B (EDER, 1997; CHEN; GOEDDEL, 2002) e, conseqüentemente, também induzem a síntese de IL-6 (WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014; HUNTER; JONES, 2015;). Esta, por sua vez, sinaliza por um complexo receptor formado pelo receptor de IL6 (IL-6R) e a subunidade transdutora de sinal glicoproteína 130. O receptor de IL-6 pertence ao receptor da família das citocinas e sua sinalização ocorre por ativação da via JAK/STAT, podendo também ativar a via das MAPK e da PI3K (EULENFELD et al., 2012; SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Dessa forma, o LPS causa uma resposta inflamatória redundante, cujas citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como o TLR4, utilizam vias em comum, sendo essas citocinas as principais mediadoras iniciais da resposta inflamatória.

Contribuindo para agravar o quadro inflamatório, a administração de LPS aumenta da permeabilidade intestinal (O'DWYER et al., 1988; GUO et al., 2013), o que leva à maior translocação de bactéria e de seus componentes para a circulação porta-hepática, resultando na ativação das células de Kupffer (SZABO, G. et al., 2010; BAWA; SARASWAT, 2013). As células de Kupffer são macrófagos residentes hepáticos que constituem o maior *pool* de macrófagos do corpo, e uma vez ativados, sintetizam grandes quantidades de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO (DECKER, 1990). A

interação desses macrófagos com diferentes células hepáticas, como os hepatócitos, células endoteliais dos sinusóides hepáticos, células estreladas, assim como com componentes celulares do sangue, como plaquetas, eritrócitos e leucócitos durante a inflamação favorece o recrutamento de neutrófilos para o fígado, causando a liberação de proteínas de fase aguda e intensificando a resposta inflamatória (TACKE; LEUDDE; TRAUTWEIN, 2009; NESSELER et al., 2012).

Além do aumento da permeabilidade intestinal, a inflamação sistêmica causa a síntese de grandes quantidades de NE pelo intestino (YANG, S et al., 2000). Essa catecolamina interage com receptores alfa2-adrenérgicos presentes no fígado e contribui para aumentar a resposta inflamatória, aumentando a secreção de TNF- α , IL-1 β , levando à disfunção hepatocelular (YANG, S. et al., 2001). A lesão hepática prejudica funções essenciais ao organismo, pois esse órgão participa de funções como a coagulação, metabolismo e imunidade. Outra função muito importante realizada pelo fígado é o processo de detoxificação e *clearance* de bactéria e de seus componentes. Nesse contexto, a lesão hepática prejudica a realização desses processos e torna o hospedeiro mais suscetível à infecções e respostas pró-inflamatórias exacerbadas (DECKER; 1990; NESSELER et al., 2012).

A administração de LPS é, portanto, um estímulo altamente estressor, e como tal, resulta na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). De fato, nossos experimentos mostraram que a administração de LPS elevou a concentração plasmática de corticosterona em todos os intervalos analisados. Tal resultado já está bem consolidado na literatura científica e apresenta uma grande relação com os mediadores inflamatórios sintetizados na fase inicial da resposta inflamatória, a saber, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO (SOTTO et al., 1998; MCCANN et al., 2000; MCCANN et al., 2002; MAXIME; LESUR; ANNANE, 2009; MOHN et al., 2005; LANDGRAF et al., 2014; INCERPI et al., 2015). Em nosso estudo, o tratamento com ghrelina não alterou o aumento de corticosterona provocado pela administração de LPS, conquanto a administração de ghrelina *per se* tenha sido capaz de aumentar sua concentração plasmática. De fato, muitos trabalhos da literatura científica já observaram a capacidade da ghrelina de ativar o eixo HPA (NAGAYA et al., 2001; KAGEYAMA et al., 2011; NEMOTO et al., 2011; CABRAL et al., 2012;). A manutenção de altas concentrações de corticosterona durante quadros inflamatórios é importante, pois este hormônio apresenta características anti-inflamatórias importantes. No entanto, deve-se ressaltar a importância do equilíbrio entre respostas pró-inflamatórias e respostas

anti-inflamatórios, uma vez que é importante combater o agente estressor (no caso, o LPS) sem, contudo, provocar uma resposta exacerbada e prolongada, o que é prejudicial ao próprio hospedeiro (NDUKA; PARRILLO, 2011).

Como esperado, a infusão de LPS no nosso modelo também causou, além do aumento na concentração plasmática de corticosterona, aumento sérico e hepático dos moduladores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO. Diversos órgãos e tecidos participam da síntese e liberação desses moduladores inflamatórios durante a endotoxemia, como o baço (ROSAS-BALLINA et al., 2008; VALDÉS-FERRER et al., 2013;) e macrófagos peritoneais (SAIA et al., 2013). O tratamento com ghrelina conseguiu atenuar o aumento de todas citocinas avaliadas, tanto no fígado como no sangue, indo ao encontro dos experimentos já descritos na literatura científica que evidenciam as propriedades anti-inflamatórias da ghrelina.

Muitos estudos mostram que os efeitos anti-inflamatórios da ghrelina são dependentes do nervo vago, pois a vagotomia abole esses efeitos (WU et al., 2007a; WU et al., 2008; WU et al., 2009a; CHEYUO et al., 2011; RAJAN et al., 2012; KHOWAILED et al., 2015). O nervo vago é composto por fibras aferentes e eferentes. Os sinais aferentes alcançam o NTS, que se interconecta com o núcleo dorsal motor do vago (DMV), local de onde a maioria dos eferentes vagais se originam (WANG; YIN; YAO, 2016). A estimulação do nervo vago leva à ativação de uma via anti-inflamatória, a qual ainda não está completamente elucidada. Atualmente, evidências apontam que a ativação da subunidade α -7 do receptor nicotínico da acetilcolina (α 7nAChR), presente em macrófagos e outras células do sistema imunológico, levam à redução da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL6 (BOROVIKOVA et al., 2000; PAVLOV et al., 2003; TRACEY et al., 2007; ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009; MARTELLI; MCKINLEY; MCALLEN, 2014; WANG; YIN; YAO et al., 2016)

Dessa forma, um possível mecanismo pelo qual a ghrelina exerce suas ações anti-inflamatórias é através da ativação da via anti-inflamatória colinérgica, pois, de fato, o GHSR é expresso no núcleo do trato solitário (NTS) e no DMV (LIN et al., 2004). Ainda, Date et al. (2002) observaram que 45% dos corpos celulares do gânglio nodoso dos ratos possuem receptores para ghrelina. Além disso, a administração de ghrelina aumenta a marcação de c-fos no NTS e DMV (LI, Y. et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2007). Tais dados em conjunto dão suporte à hipótese de ativação vagal pela ghrelina e a subsequente atenuação da inflamação por meio dessa via.

As ações anti-inflamatórias da ghrelina podem ainda vir da interação com o sistema nervoso simpático. Vários trabalhos mostraram que a ghrelina diminui a atividade do sistema nervoso simpático e a concentração plasmática de NE. (MATSUMURA et al., 2002; LIN et al., 2004; WU et al., 2007c; MANO-OTAGIRE et al., 2009; FERENS et al., 2010; CALLAGHAN et al., 2012; SCHEWNKE et al., 2012; SOEKI et al., 2013; MAO et al., 2013). Alguns desses estudos também mostraram a presença de GHSR-1a nos neurônios simpáticos pré-ganglionares (FERENS et al., 2010; CALLAGHAN et al., 2012). A redução da atividade simpática pela ghrelina pode ser benéfica, pois a ativação da via simpática, com a subsequente liberação de NE, pode levar ao aumento de citocinas pró-inflamatórias devido ativação dos receptores adrenérgicos tipo alfa (SZELÉNYI; KISS; VIZI, 2000; YANG, S. et al., 2000; YANG, S. et al., 2001; MIKSA et al., 2005).

O mecanismo anti-inflamatório da ghrelina pode ainda ocorrer por ações diretas sobre células do sistema imunológico, conforme diferentes estudos observaram. Waseem et al. (2008) encontraram GHSR-1a em linhagens de macrófagos (RAW 264.7) de ratos, e o tratamento com ghrelina atenuou o aumento de TNF- α e IL-1 β induzido pelo LPS. A presença do receptor da ghrelina em linhagem de macrófagos alveolares também foi observado por Li, B. et al. (2015). Granado et al. (2005) mostraram que em culturas de macrófagos peritoneais tratadas com LPS, o tratamento com ghrelina reverteu o aumento de IL-6 e diminuiu o aumento de nitrito.

Além das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, o NO é um modulador importante durante a endotoxemia. Trata-se de um gás de curta meia-vida (de 6 a 30 segundos) (TRIPATHI; KASHAYAP; SINGH, 2007; TOUSOULIS et al., 2012) e sua descoberta veio a partir de estudos sobre a musculatura vascular lisa (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). É sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que utiliza o aminoácido L-arginina como substrato. Existem três isoformas da NOS, sendo duas constitutivas e dependentes de cálcio e uma induzível e independente de cálcio. As isoformas constitutivas são a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS). A isoforma induzível da NOS é denominada iNOS (PARRAT et al., 1998; LANGE et al., 2009; HOLLENBERG; CINEL, 2009; FOGAÇA et al., 2012; BROWN et al., 2012;). Apesar da importante participação das NOS constitutivas, a alta síntese observada durante quadros altamente inflamatórios está relacionada à atividade da iNOS, e esta é transcrita a partir do fator de transcrição NF- κ B (PARRAT et al., 1998; BENZ et al., 2002; TRIPATHI; KASHAYAP; SINGH, 2007; FORTIN et al., 2010)

A ação mais clássica do NO é a vasodilatação. Por ser um gás, permeia livremente a membrana celular sem transportadores específicos. Uma vez dentro das células da musculatura lisa vascular, esse gás ativa a guanilato ciclase solúvel, levando à formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Segue-se, então, uma cascata de sinalização intracelular, culminando na redução da concentração de cálcio intracelular, que por sua vez resulta em vasorelaxamento (FORTIN et al., 2010; CIRINO; VELLECCO; BUCCI, 2017).

Esse gás é capaz de inibir proteínas que possuam ferro em seus centros catalíticos e de interferir no DNA, possuindo, portanto, propriedades citostáticas e citotóxicas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Nesse sentido, Qiu et al. (2012) observaram que em uma linhagem de células de macrófagos de ratos (J774A) infectados com a bactéria gram-negativa *Acinetobacter baumannii*, o pré-tratamento com N^w-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) ou NG-metil-L-arginina (L-NMMA), inibidores das NOS, levou os macrófagos a mataram menos bactérias fagocitadas, evidenciando a citotoxicidade do NO e seu papel bactericida. Os efeitos do NO também podem ocorrer indiretamente, a partir da formação de peroxinitrito (ONOO⁻). O ONOO⁻ é formado a partir da reação entre o NO e o ânion superóxido e pode oxidar grupos sulfidrilas e tioéters, interagir com lipídeos e ácidos aracdônicos, causar nitração e hidroxilação de compostos aromáticos e inibir enzimas críticas da cadeia respiratória mitocondrial (ORTEGA MATEO; ARTIÑANO, 2000; SZABÓ, C; MÓDIS, 2010).

Além da ação clássica de vasodilatação, o NO é importante para diminuição da agregação plaquetária, diminuição da adesão leucocitária e neutrofílica, diminuição da síntese de citocinas e também funciona como *scavenger* de radicais livres (PARRAT et al., 1998; CAUWELS et al. 2011; TOUSOULIS et al., 2012; GUIMIRE et al., 2017). Contudo, apesar de suas importantes ações durante situações fisiológicas e patológicas, o excesso de NO está relacionado à queda da pressão arterial e a consequente má perfusão sanguínea, contribuindo para a ocorrência de disfunções de órgãos (PARRAT et al., 1998; JEAN-BAPTISTE, 2007; LEVY et al., 2010; RUSSEL; RUSH; BOYD, 2018). Em síntese, a presença do NO é importante para a homeostase do organismo, contudo, seu excesso pode ser prejudicial.

Em nosso modelo experimental, a administração de LPS elevou significativamente a concentração sérica de nitrato (molécula estável gerada a partir do NO) no intervalo de 6h e 12h. Esse aumento circulante detectado no intervalo de

6h está de acordo com outros trabalhos do nosso laboratório (BATALHÃO et al., 2008; SAIA et al., 2013) e está relacionado à atividade da iNOS, uma vez que outros pesquisadores observaram a expressão proteica da iNOS em fígados de ratos *Wistar* (SAIA et al., 2013) e de camundongos (CONNELLY; MADHANI; HOBBS, 2005) submetidos à endotoxemia 6 horas após administração de LPS, assim como em fígados de ratos *Wistar* submetidos à CLP 7h após o início do experimento (EYENGA et al., 2010).

Além disso, esses trabalhos também evidenciam a participação do fígado na síntese de NO ao constatarem atividade da iNOS nesse órgão. O fígado é composto por diferentes tipos de células, sendo as células endoteliais, os hepatócitos e as células de Kupffer as células mais estudadas no contexto de síntese e liberação de NO. A correlação entre essas células é complexa, pois apesar das células de Kupffer e os hepatócitos sintetizarem NO (DECKER, 1990; HARBRECHT; BILLIAR, 1995; MURIEL, 2000), experimentos de co-cultura (células de Kupffer e hepatócitos provenientes de ratos *Wistar*) mostraram maior síntese desse gás do que as culturas isoladas (células de Kupffer ou hepatócitos) (CURRAN et al., 1989; BILLIAR et al., 1990).

Diferente da consolidação na literatura científica acerca do aumento na síntese de NO proveniente do estímulo com LPS, a relação entre a ghrelina e o NO dentro do contexto da endotoxemia não está bem consolidada. Em um diferente contexto experimental, Xu, X. et al. (2008) mostraram que a ghrelina *per se* aumentou a fosforilação da eNOS e o acúmulo de NO no meio de cultura de células endoteliais de veias umbilicais de humanos, assim como aumentou a fosforilação da eNOS em aortas isoladas de camundongos. Ao encontro desses resultados, Sudar et al. (2011) trataram ratos *Wistar* com ghrelina intracerebroventricularmente por cinco dias consecutivos e observaram aumento de nitrito e nitrato no soro dos animais, o que foi relacionado ao aumento da síntese da iNOS, evidenciado pelo aumento na expressão proteica dessa sintase no coração dos animais. Tais resultados também estão de acordo com o trabalho de Wang, Y. et al. (2011). Neste, os autores realizaram cultura de células endoteliais microvascular cardíacas provenientes de ratos *Sprague-Dawley* e as trataram com ghrelina, que aumentou significativamente a produção de NO.

Em contrapartida, em tecido renal, o tratamento com ghrelina *per se* não alterou a expressão gênica de nNOS nem de eNOS em ratos, muito embora nos ratos em dieta com alto teor de sal (ratos sensíveis a sal - *Dahl-Iwai*), a ghrelina aumentou

a expressão gênica da nNOS, o que foi acompanhado do aumento na excreção urinária de nitrato (AOKI et al., 2013). No modelo de isquemia musculocutânea, outra condição adversa, o tratamento com ghrelina em camundongos promoveu vasodilatação, diminuiu a hipóxia, reduzindo a área necrosada, e isso foi relacionado ao aumento na expressão proteica da iNOS, que consequentemente resulta em maior produção de NO (REZAEIAN et al., 2011).

Em nossos experimentos, a ghrelina *per se* não alterou os níveis plasmáticos de NO. Apesar desses resultados irem aparentemente contra outros estudos acima citados, resposta similar foi encontrada por Granado et al. (2005), onde ratos *Wistar* tratados somente com GHRP-2, um agonista sintético do GHSR-1a, também não modificaram as concentrações séricas de nitrito/nitrato. Ainda, diferenças experimentais devem ser consideradas. Nesse sentido, Sudar et al. (2011) observaram aumento do nitrito/nitrato circulante, porém, realizaram infusão de ghrelina icv por um tempo prolongado, enquanto em nosso estudo a ghrelina foi administrada endovenosamente em apenas um *bolus*.

Já nos animais submetidos à endotoxemia, nossos estudos mostraram que o tratamento com ghrelina reduziu significativamente a concentração plasmática de nitrato no intervalo de 12h. Poucos são os estudos do nosso conhecimento que relacionam ghrelina, inflamação sistêmica e NO, sendo que não encontramos nenhum que induza a inflamação sistêmica com LPS. Em modelo de CLP em ratos *Sprague-Dawley*, Zeng et al. (2015) observaram que macrófagos alveolares dos ratos tratados submetidos ao CLP e tratados com ghrelina aumentaram a expressão gênica da iNOS, assim como sua expressão proteica na parte superior do lobo direito do pulmão. Porém, deve-se levar em consideração que o citado estudo quantifica o mRNA e a proteína no pulmão e não dosaram o NO sanguíneo, que pode não acompanhar o mesmo padrão das variáveis pulmonares estudadas.

A diminuição de nitrato observado em nossos experimentos pode ser consequência da diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e pode também favorecer a integridade do fígado por reduzir a excessiva produção de NO e a subsequente formação de ONOO⁻. O mecanismo pelo qual o tratamento com ghrelina atenuou o aumento sistêmico de NO no nosso trabalho é desconhecido, mas sugere-se diminuição da síntese de NO pelas células hepáticas, já anteriormente descritas como uma importante fonte da produção desse gás. Essa hipótese é sustentada por trabalhos da literatura científica, os quais observaram que cultura de

macrófagos peritoneais estimulados com LPS na presença de ghrelina (CHORNY et al., 2008; GRANADO et al., 2005) ou GHRP-2 (GRANADO et al., 2005) tiveram menor detecção de nitrito no meio. Em co-cultura de hepatócitos e células não parenquimatosas estimuladas com LPS, a adição de GHRP-2 também atenuou a produção de nitrito.

A diminuição dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO observada em nossos experimentos pode favorecer a integridade do fígado, órgão frequentemente comprometido durante quadros altamente inflamatórios. De fato, diversos trabalhos já observaram redução dos marcadores de lesão tecidual AST e ALT, assim como redução de lactato após o tratamento com ghrelina em condições inflamatórias como hepatite induzida por concavalina (MAO et al., 2015b), doença hepática gordurosa não alcoólica (MAO et al., 2015a) lesão renal e intestinal por isquemia/reperfusão (WU et al., 2008; RAJAN et al., 2012), endotoxemia (CHANG et al., 2003b) e CLP (CHANG et al., 2003a; Wu et al., 2007a).

A integridade da função hepático é importante, entre outros fatores, pois é um órgão-chave para o funcionamento adequado do eixo GH/IGF-1. Em nosso estudo, não era esperado que a administração de ghrelina aumentasse o GH nos horários observados devido ao *time-course* de liberação de GH após administração de ghrelina. A ghrelina possui meia-vida de 30 minutos no rato (TOLLE et al., 2002) e causa rápida liberação de GH. Em ratos, a administração de ghrelina eleva os níveis plasmáticos de GH, causando pico desse hormônio entre 5 e 20 minutos, com subsequente diminuição e retorno aos níveis basais dentro da primeira hora (DATE et al., 2000b; WREN et al., 2000; TANNENBAUM; EPELBAUM; BOWERS, 2003). Portanto, como a primeira aferição da concentração plasmática de GH ocorreu após 2h da administração de ghrelina, não observamos o aumento circulante de GH.

Ainda que não tenhamos observado efeito da ghrelina sobre o GH, sua administração ocasionou uma redução na concentração sérica de IGF-1 no intervalo de 2h. Nesse momento, a concentração plasmática de ghrelina ainda se encontrava alta. A correlação negativa entre ghrelina e IGF-1 endógenos já foi observada em estudos com humanos (BELLONE et al., 2003; PÖYKKÖ et al., 2005). Em seu estudo, Pöykkö et al. (2005) sugeriram um possível *feedback* negativo entre o IGF e a ghrelina. Tal resultado a princípio parece paradoxal, pois a administração de ghrelina causa liberação de GH, que por sua vez induz a síntese de IGF-1. Outro dado aparentemente contraditório é que uma vez que a infusão de ghrelina aumenta a ingesta alimentar,

os níveis circulantes de IGF-1 também deveriam aumentar. Esse aumento na ingesta deveria ser acompanhado pelo aumento de insulina, que promove a síntese de IGF-1 pelos hepatócitos (PAO et al., 1993; KRISHNA et al., 1996; FRYSTYK, 2004; LIVINGSTONE et al., 2013). A insulina, no entanto, não atua somente estimulando a síntese de IGF-1, mas também inibindo a síntese de IGFBP-1 (PAO et al., 1993; LEE et al., 1997; FRYSTYK, 2004). Uma vez que as IGFBPs aumentam a meia-vida do IGF-1, a redução da IGFBP-1 aumenta o IGF-1 livre no sangue, que por sua vez possui meia-vida curta, o que acarretaria em redução na concentração sérica de ghrelina. Além disso, deve ser levado em consideração o efeito da ghrelina exógena sobre a concentração sanguínea de insulina. Diversos estudos mostraram que a ghrelina inibe a liberação de insulina em resposta à glicose em ratos (EGIDO et al., 2002), camundongos (REIMER; PACINI; AHRÉN, 2003; DEZAKI et al., 2004) sendo, portanto, um provável mecanismo de redução dos níveis séricos de IGF-1, uma vez que a insulina promove a síntese desse peptídeo. Entretanto, para elucidar o mecanismo pelo qual a administração exógena de ghrelina causou a redução da concentração sérica de IGF-1 no intervalo de 2h, mais experimentos devem ser realizados.

O IGF-1, no entanto, apesar de ser controlado por diversos fatores, como a insulina acima citada, tem o GH como uma das principais moléculas capazes de induzir sua síntese. Apesar disso, em nossos experimentos observamos que no intervalo de 12h ocorreu diminuição na concentração sérica de GH sem diminuição concomitante na concentração sérica de IGF-1 nos animais que receberam apenas ghrelina. Entretanto, é importante ressaltar que a secreção de GH ocorre de forma pulsátil e que entre os pulsos a concentração de GH é mínima ou indetectável, ou seja, ocorre com grande variabilidade durante o dia (ROZÁRIO; LLOYD; RYAN, 2000). Por ter uma meia-vida maior e apresentar-se mais estável no sangue durante o dia, o IGF-1 é utilizado como medida indireta dos níveis de GH em alguns casos clínicos (CHANSON; SALENAVE, 2008). Desse modo, a diminuição do GH sem a diminuição concomitante do IGF-1 em 12h pode ser apenas uma variação ultradiana característica do GH.

Nossos animais que foram submetidos a endotoxemia tiveram os níveis séricos de IGF-1 e do GH reduzidos em todos os intervalos analisados. Esse resultado está de acordo com vários estudos da literatura que mostram redução nos níveis circulantes de IGF-1 e GH em ratos após administração de LPS (FAN et al., 1994;

FAN et al., 1995a; SOTO et al., 1998; PRIEGO et al., 2003; PRIEGO et al., 2004;). A diminuição do GH circulante é observada em altas doses de LPS e pode ser consequência do aumento da liberação de somatostatina hipotalâmica, que por sua vez atua nos somatotrofos da adenohipófise, diminuindo a liberação de GH para a circulação sistêmica (SOTO et al., 1998; PRIEGO et al., 2005). Os estudos da literatura científica sugerem que esse aumento na síntese e liberação de somatostatina hipotalâmica e a diminuição do GH circulante após administração de LPS é mediado pela IL-1 β (HONEGGER et al., 1991; RETTORI et al., 1994; PEISEN et al., 1995; MCCANN et al., 2000) e pelo NO (MCCANN et al., 2000; MCCANN et al., 2002; PRIEGO et al., 2005) sendo que a IL-1 β pode exercer essa ação através da indução da síntese de NO.

Ainda que não saibamos o mecanismo exato que levou à queda nas concentrações sanguíneas de GH e IGF-1, observamos que o tratamento com ghrelina foi capaz de atenuar a queda de IGF-1 sérica induzida pelo LPS em 12h. Esse resultado sugere uma possível recuperação, ou mesmo um menor comprometimento do eixo GH/IGF-1. Embora os mecanismos que desencadeiam o rompimento desse importante eixo ainda sejam controversos, muitos trabalhos sugerem a participação do TNF- α , IL-1 β , IL-6, mediadores esses que tiveram sua concentração no sangue diminuída nos ratos endotoxêmicos tratados com ghrelina em nossos experimentos.

Para melhor compreender a contribuição dessas citocinas nesse contexto, muitos autores utilizaram diferentes técnicas e procedimentos. Em trabalhos com culturas de hepatócitos tratadas com TNF- α e estimuladas com GH, as células hepáticas apresentaram redução no aumento da expressão gênica de IGF-1 e GHR, da fosforilação da JAK2, da fosforilação do GHR e da ativação e ligação da STAT5 ao DNA, em relação às células apenas tratadas com GH (WOLF et al., 1996; THISSEN; VERNIERS, 1997; YUMET et al., 2002; AHMED et al., 2006; ZHAO et al., 2014). Em ratos, a infusão de TNF- α diminuiu a concentração plasmática de GH e IGF-1, bem como a expressão gênica de GHR e IGF-1 no fígado (FAN et al., 1995a; WANG, P. et al., 2002). Outros trabalhos mostraram a participação dessa citocina através do bloqueio de suas ações. Assim, observaram que o tratamento com anticorpo anti-TNF atenuou a diminuição sérica do IGF-1 induzida pelo LPS (FAN et al., 1995a) e a infusão da proteína ligadora do TNF (TNFbp), outra forma de diminuir a ação do TNF- α , também atenuou a disparidade entre o GH e o IGF-1, além de atenuar a redução

da expressão gênica de IGF-1 e GHR em ratos *Sprague-Dawley* submetidos à sepse abdominal por inoculação de *E.coli* e *B. fragilis* (YUMET et al., 2002). Yumet et al. (2002) mostraram que o TNF- α inibe a duração da sinalização do GH na via JAK/STAT, propondo ser esse um possível mecanismo utilizado pelo TNF- α para alterar o eixo GH/IGF-1. Opondo-se a esse possível mecanismo, Ahmed et al. (2006) mostraram que em hepatócitos, os efeitos inibitórios do TNF- α na expressão gênica de IGF-1 induzida pelo GH eram independentes da atividade da STAT5. Outro mecanismo proposto vem da observação de que em cultura de hepatócitos provenientes de ratos *Wistar*, o tratamento conjunto de TNF- α e GH aumentou a expressão gênica de SOCS-3 mais do que o tratamento isolado de GH (COLSON et al., 2000). Portanto, é possível que o TNF- α promova o rompimento do eixo GH/IGF-1 a partir do aumento da síntese da SOCS-3, que por sua vez exerce um efeito feedback negativo na sinalização da via JAK/STAT.

Já outros pesquisadores discordam quanto ao mecanismo e à importância do TNF- α sobre o rompimento do eixo em questão. Denson et al. (2003) observaram que não houve diferença na inibição da STAT5 e sua subsequente ligação ao DNA induzidas pelo LPS em camundongos knockout para o receptor do TNF- α tipo 1. Colson, Willems e Thissen (2003) mostraram que a inibição da síntese de TNF- α com pentoxifilina não alterou a diminuição de IGF-1 plasmático e IGF-1 mRNA no fígado de ratos submetidos à endotoxemia, sugerindo que o TNF- α não participa na resistência hepática ao GH.

Em relação à participação da IL-1 β no processo de alteração do eixo GH/IGF-1, numerosos estudos também foram realizados. Em culturas de hepatócitos incubados com IL-1 β , alguns resultados foram semelhantes aos obtidos com o TNF- α . Desse modo, muitos autores observaram redução na expressão gênica de IGF-1 e GHR, assim como quantidade de STAT5 fosforilada (WOLF et al., 1996; THISSEN; VERNIERS, 1997; SHUMATE et al., 2005; ZHAO et al., 2014). Quanto ao mecanismo pelo qual a IL-1 β poderia alterar o eixo GH/IGF-1, Shumate et al. (2005) observaram que apesar do tratamento com IL-1 β ter reduzido a expressão proteica hepática de STAT5 fosforilada no núcleo após estímulo com GH, a ligação da STAT5 ao DNA não foi alterada. Boisclair et al. (2000), no entanto, observaram outro mecanismo. Os autores observaram que em cultura de hepatomas, a IL-1 β inibiu a expressão gênica de ALS induzido pelo GH. ALS faz parte do complexo ternário IGF/IGFBP3/ALS e a diminuição da sua síntese pode levar a redução da meia-vida do IGF-1, favorecendo

sua redução na circulação sanguínea. Corroborando a participação da IL-1 β na alteração do eixo, o tratamento com antagonistas do receptor de IL-1 β atenuou as alterações no GH e IGF-1 circulante em modelos de endotoxemia e sepse abdominal (PEISEN et al., 1995; LANG et al., 1998).

Somado ao TNF- α e à IL-1 β , a IL-6 apresenta grande potencial para interferir na integridade do eixo GH/IGF-1. A ativação do receptor dessa citocina (IL-6) leva à ativação da via JAK/STAT (MIHARA et al., 2012), uma particularidade que não ocorre com as duas outras citocinas anteriormente citadas. A relevância desse fenômeno baseia-se no fato de ser essa a mesma via utilizada na sinalização do GHR. Assim como para o TNF- α e a IL-1 β , os possíveis mecanismos com que a IL-6 poderia contribuir para a alteração do eixo GH/IGF-1 foram estudados por diversos pesquisadores. Ahmed et al. (2007) observaram que o tratamento de hepatócitos com IL-6 prejudicou a fosforilação da STAT5 e sua subsequente ligação ao DNA. Esse mesmo trabalho também mostrou que a IL-6 reduziu a expressão gênica de IGF-1 induzida pelo estímulo de GH. Já Denson et al. (2003) mostraram que no fígado de camundongos knockout para IL-6, o LPS não foi capaz de inibir a ativação da STAT5 induzida pelo GH. Ainda, observaram que nesses animais, não houve aumento de CIS e SOCS-3. Corroborando esses resultados, Zhao et al. (2014) mostraram que a neutralização de IL-6 em camundongos reverteu o aumento de SOCS-3 e atenuou a queda da expressão genica de IGF-1 hepática induzida pelo LPS. De fato, já foi relatado correlação negativa entre os níveis plasmáticos de IL-6 e IGF-1 em humanos (PAPASTATHI et al., 2013) e correlação positiva entre IL-6 e SOCS-3 em ratos (WANG, P. et al., 2002).

Durante a inflamação sistêmica induzida pelo LPS no nosso modelo experimental, ainda que apresentando diferentes cinéticas, observamos o aumento concomitante das três citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6). Portanto, deve-se considerar a ação conjunta das citocinas nesse contexto. Nesse sentido, Colson et al. (2000) mostraram que o tratamento com IL-1 β em hepatócitos estimulados com GH teve resultado semelhante ao tratamento com TNF- α nesse mesmo tipo de cultura, ou seja, ocorreu uma potencialização do aumento de SOCS-3 e CIS. Ainda nesse pensamento mais abrangente, Zhao et al. (2014) mostraram que a neutralização conjunta do TNF- α e IL-1 β em camundongos submetidos à endotoxemia, atenuou a queda na expressão gênica e proteica de GHR hepática e, conseqüentemente, observaram aumento na expressão gênica de IGF-1.

Deve-se ressaltar, ainda, a participação do NO na alteração do eixo GH/IGF-1. Priego et al. (2003) mostraram que o uso de um inibidor da iNOS (aminoguanidina, ip) preveniu diminuição do IGF-1 sérico em ratos *Wistar*, embora não tenha prevenido a queda na concentração sérica de GH. A prevenção da redução sérica de IGF-1 pode ser relacionado a outro resultado do trabalho, sendo este que o uso da aminoguanidina atenuou a redução na expressão gênica de IGF-1 hepática. Ainda nesse mesmo trabalho, os autores observaram que o tratamento com aminoguanidina preveniu a queda de IGFBP3 provocada pela administração ip de LPS. Desse modo, o NO é um possível modulador da resposta do eixo GH/IGF-1 em resposta à endotoxemia.

Em conjunto, os dados obtidos da literatura científica apresentam ampla possibilidades de mecanismos de alteração do eixo GH/IGF-1. Por isso, decidimos investigar possíveis mecanismos dentro do nosso modelo experimental. No presente trabalho, a redução do IGF-1 circulante observada após administração de LPS não está relacionada a diminuição da expressão proteica de GHR. Esse resultado está de acordo com outros estudos sobre inflamação, os quais também observaram redução do IGF-1 circulante sem observarem alteração da expressão proteica do GHR no fígado total de ratos submetidos à sepse abdominal (YUMET et al., 2002; YUMET et al., 2006) e em cultura de hepatócitos tratadas com IL-1 β (SHUMATE et al., 2005) e IL-6 (AHMED et al., 2007). Apesar de não termos observado alterações na expressão proteica do GHR nos animais submetidos à endotoxemia, observamos diminuição na expressão gênica desse receptor no intervalo de 6h, o que também está de acordo com outros trabalhos da literatura científica que observaram redução na concentração sanguínea de IGF-1 em contextos de inflamação (DEFALQUE et al., 1999; PRIEGO et al., 2002; PRIEGO et al., 2003; DIFEDELE et al., 2005; GRANADO et al., 2006; GRANADO et al., 2008). A partir desse dado, acreditamos que análises de intervalos posteriores, por exemplo, de 24h, poderíamos observar redução na expressão proteica do GHR, contribuindo para alteração do eixo GH/IGF-1 posteriormente.

Mesmo que não tenhamos observado alteração na expressão proteica de GHR, a sinalização intracelular provocada pela interação do GHR com o GH pode estar comprometida, pois observamos redução na expressão gênica de IGF-1 dos animais tratados com LPS. Novamente, resultados similares foram relatados por outros pesquisadores em diferentes contextos inflamatórios como colite (DIFEDELE et al., 2005), endotoxemia (DEFALQUE et al., 1999; PRIEGO et al., 2002; WANG, P.

et al., 2002; PRIEGO et al., 2003; COLSON; WILLEMS; THISSEN, 2003; PRIEGO et al., 2004) e cultura de hepatócitos tratadas com IL-1 β (WOLF et al., 1996). Contudo, afirmar que a diminuição do IGF-1 circulante provém da diminuição do IGF-1 mRNA pode ser equivocado, até mesmo porque a alteração na concentração de IGF-1 mRNA em nossos experimentos foi observada somente no intervalo de 6h, enquanto a redução na concentração circulante de IGF-1 foi observada já no intervalo de 2h. Desse modo, mais investigações relacionadas a isso são necessárias, como por exemplo a quantificação de diferentes IGFBP's e alterações pós-transcricionais do IGF-1.

Conforme anteriormente descrito, o tratamento com ghrelina atenuou a redução na concentração de IGF-1 sérico. Uma vez que o fígado é o principal órgão responsável pela produção de IGF-1 circulante, decidimos investigar a expressão proteica do GHSR-1a nesse órgão. A administração de LPS elevou a expressão proteica do receptor apenas no intervalo de 2h. Esse aumento na fase inicial da inflamação também foi relatado por Wu et al. (2004) em modelo de CLP em ratos *Wistar*. Os autores observaram que na fase hiperdinâmica da sepse polimicrobial, o receptor de ghrelina estava aumentado no coração, aorta e intestino. É interessante observar que o aumento na expressão desse receptor no fígado ocorre anteriormente à redução dos níveis plasmáticos de ghrelina nos animais endotoxêmicos, o que permite uma maior ação e sensibilidade à ghrelina endógena.

O LPS na dose utilizada em nosso estudo não aumentou significativamente a mortalidade, porém, o aumento nos níveis séricos de IGF-1 observado nos animais submetidos à endotoxemia após o tratamento com ghrelina pode favorecer a sobrevida. Hunninghake et al. (2010) mostrou que o tratamento com IGF-1 reduz a translocação de bactérias intestinais em camundongos após inoculação intratraqueal de *P. aeruginosa*. Ashare et al. (2008) também observaram que em camundongos submetido à inoculação intratraqueal de *P. aeruginosa*, o tratamento com IGF-1 reduziu o aumento de TNF- α e IL-6 no fígado, melhorou o *clearance* bacteriano hepático, atenuou o aumento de ALT, levando ao aumento da sobrevida na sepse. O efeito benéfico do tratamento com IGF-1 também foi relatado por Inoue et al. (1995). Esses pesquisadores observaram que o tratamento com IGF-1 aumentou a sobrevida em camundongos submetido à sepse de origem abdominal. Nesse estudo, o tratamento com IGF-1 em altas concentrações diminuiu as bactérias no fígado e no sangue, além de reduzir as concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no plasma.

Em resumo, o tratamento com ghrelina atenuou a redução dos níveis séricos de IGF-1 nos animais endotoxêmicos, sugerindo uma possível melhora na integridade do eixo GH/IGF-1. O mecanismo exato no qual a ghrelina atenuou a queda de IGF-1 induzida pelo LPS é incerto e mais estudos precisam ser realizados. Porém, nossos resultados sugerem que a ação anti-inflamatória da ghrelina, reduzindo os moduladores TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO, possa estar envolvida nesse processo.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A propriedade anti-inflamatória da ghrelina levou à redução do aumento dos mediadores pró-inflamatórios e contribuiu para a manutenção da integridade do eixo GH/IGF-1 ao atenuar a queda na concentração sanguínea de IGF-1 nos animais endotoxêmicos.

REFERÊNCIAS

Referências

AHMED, S. F.; FARQUHARSON, C. The effect of GH and IGF1 on linear growth and skeletal development and their modulation by SOCS proteins. **J Endocrinol**, v. 206, n. 3, p. 249-59, Sep 2010. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631046> >.

AHMED, T. et al. Tumor necrosis factor inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 1, p. G35-44, Jul 2006. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574984> >.

AHMED, T., et al. Interleukin-6 inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, n. 6, p. G1793-803, Jun 2007. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395896> >.

AOKI, H. et al. Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. **Endocr J**, v. 60, n. 5, p. 571-81, 2013. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328675> >.

ASHARE, A. et al. Insulin-like growth factor-1 improves survival in sepsis via enhanced hepatic bacterial clearance. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, n. 2, p. 149-57, Jul 2008. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436791> >.

BALLINGER, A. B. et al. Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis. **Gut**, v. 46, n. 5, p. 694-700, May 2000. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764714> >.

BANKS, W. A. et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 302, n. 2, p. 822-7, Aug 2002. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130749> >.

BAREGAMIAN, N. et al. IGF-1 protects intestinal epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. **J Surg Res**, v. 136, n. 1, p. 31-7, Nov 2006. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16999977> >.

BASA, N. R. et al. Bacterial lipopolysaccharide shifts fasted plasma ghrelin to postprandial levels in rats. **Neurosci Lett**, v. 343, n. 1, p. 25-8, May 2003. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749989> >.

BATALHÃO, M. E. et al. Role of dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock. **Regul Pept**, v. 147, n. 1-3, p. 67-71, Apr 2008. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243366> >.

BAWA, M.; SARASWAT, V. A. Gut-liver axis: role of inflammasomes. **J Clin Exp Hepatol**, v. 3, n. 2, p. 141-9, Jun 2013. ISSN 0973-6883. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755488> >.

BELLONE, S. et al. Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. **J Endocrinol Invest**, v. 26, n. 4, p. RC9-11, Apr 2003. ISSN 0391-4097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12841532> >.

BENZ, D. et al. Tonal nitric oxide and health--a free radical and a scavenger of free radicals. **Med Sci Monit**, v. 8, n. 1, p. RA1-4, Jan 2002. ISSN 1234-1010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782688> >.

BILLIAR, T. R. et al. Kupffer cell:hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. **J Surg Res**, v. 48, n. 4, p. 349-53, Apr 1990. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2187113> >.

BOISCLAIR, Y. R. et al. Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1beta on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 6, p. 3841-7, Feb 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660535> >.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-62, May 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839541> >.

BRIARD, N. et al. IGF-I/IGFBPs system response to endotoxin challenge in sheep. **J Endocrinol**, v. 164, n. 3, p. 361-9, Mar 2000. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694376> >.

BROWN, R. E. et al. Control of sleep and wakefulness. **Physiol Rev**, v. 92, n. 3, p. 1087-187, Jul 2012. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811426> >.

CABRAL, A. et al. Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31462, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363652> >.

CALLAGHAN, B. et al. Sites of action of ghrelin receptor ligands in cardiovascular control. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 8, p. H1011-21, Oct 2012. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22886413> >.

CAROW, B.; ROTTENBERG, M. E. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. **Front Immunol**, v. 5, p. 58, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600449> >.

CARTER-SU, C. et al. Signalling pathway of GH. **Endocr J**, v. 43 Suppl, p. S65-70, Oct 1996. ISSN 0918-8959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9076344> >.

CASTRO, M.; FIGUEIREDO, F.; MOREIRA, A. C. Time-course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. **Horm Metab Res**, v. 27, n. 1, p. 10-5, Jan 1995. ISSN 0018-5043. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729785> >.

CAUWELS, A.; BROUCKAERT, P. Nitrite regulation of shock. **Cardiovasc Res**, v. 89, n. 3, p. 553-9, Feb 2011. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889760> >.

CHANG, L. et al. Effect of ghrelin on septic shock in rats. **Acta Pharmacol Sin**, v. 24, n. 1, p. 45-9, Jan 2003a. ISSN 1671-4083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511228> >.

CHANG, L. Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 473, n. 2-3, p. 171-6, Jul 2003b. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892835> >.

CHANSON, P.; SALENAVE, S. Acromegaly. **Orphanet J Rare Dis**, v. 3, p. 17, Jun 2008. ISSN 1750-1172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18578866> >.

CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1634-5, May 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040173> >.

CHEYUO, C. et al. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. **Shock**, v. 35, n. 3, p. 258-65, Mar 2011. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720512> >.

CHORNY, A. et al. Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria. **J Immunol**, v. 180, n. 12, p. 8369-77, Jun 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523304> >.

CIRILLO, F. et al. Inflammatory Diseases and Growth: Effects on the GH-IGF Axis and on Growth Plate. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 9, Aug 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28858208> >.

CIRINO, G.; VELLECCO, V.; BUCCI, M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 22, p. 4021-4031, Nov 2017. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28407204> >.

COLSON, A. et al. Potentiation of growth hormone-induced liver suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid by cytokines. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3687-95, Oct 2000. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014223> >.

COLSON, A.; WILLEMS, B.; THISSEN, J. P. Inhibition of TNF-alpha production by pentoxifylline does not prevent endotoxin-induced decrease in serum IGF-I. **J Endocrinol**, v. 178, n. 1, p. 101-9, Jul 2003. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844341> >.

CONNELLY, L.; MADHANI, M.; HOBBS, A. J. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10040-6, Mar 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647265> >.

CURRAN, R. D. et al. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. **J Exp Med**, v. 170, n. 5, p. 1769-74, Nov 1989. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509627> >.

DAHN, M. S.; LANGE, M. P.; JACOBS, L. A. Insulinlike growth factor 1 production is inhibited in human sepsis. **Arch Surg**, v. 123, n. 11, p. 1409-14, Nov 1988. ISSN 0004-0010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3178489> >.

DATE, Y. et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4255-61, Nov 2000a. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089560> >.

DATE, Y. et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 2, p. 477-80, Aug 2000b. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964690> >.

DATE, Y. et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1120-8, Oct 2002. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360474> >.

DAUPHINEE, S. M.; KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Lab Invest**, v. 86, n. 1, p. 9-22, Jan 2006. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357866> >.

DAVEY, H. W. et al. STAT5b is required for GH-induced liver IGF-I gene expression. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3836-41, Sep 2001. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517160> >.

DE GROOF, F. et al. Acute stress response in children with meningococcal sepsis: important differences in the growth hormone/insulin-like growth factor I axis between nonsurvivors and survivors. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 7, p. 3118-24, Jul 2002. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107211> >.

DE LA COUR, C. D.; NORLÉN, P.; HÅKANSON, R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger

compounds: a microdialysis study. **Regul Pept**, v. 143, n. 1-3, p. 118-26, Oct 2007. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573135> >.

DECKER, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). **Eur J Biochem**, v. 192, n. 2, p. 245-61, Sep 1990. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170121> >.

DEFALQUE, D. et al. GH insensitivity induced by endotoxin injection is associated with decreased liver GH receptors. **Am J Physiol**, v. 276, n. 3 Pt 1, p. E565-72, Mar 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070025> >.

DENSON, L. A. et al. Interleukin-6 inhibits hepatic growth hormone signaling via upregulation of Cis and Socs-3. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 284, n. 4, p. G646-54, Apr 2003. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519742> >.

DEZAKI, K. et al. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3142-51, Dec 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561944> >.

DIFEDELE, L. M. et al. Tumor necrosis factor alpha blockade restores growth hormone signaling in murine colitis. **Gastroenterology**, v. 128, n. 5, p. 1278-91, May 2005. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15887111> >.

DIXIT, V. D. et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. **J Clin Invest**, v. 114, n. 1, p. 57-66, Jul 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232612> >.

DORNONVILLE DE LA COUR, C. et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. **Regul Pept**, v. 99, n. 2-3, p. 141-50, Jun 2001. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384775> >.

EDER, J. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, n. 9, p. 319-22, Sep 1997. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9345850> >.

EDWARDS, C. K. et al. The macrophage-activating properties of growth hormone. **Cell Mol Neurobiol**, v. 12, n. 5, p. 499-510, Oct 1992. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1468117> >.

EDWARDS, C. K. et al. A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion. **Science**, v. 239, n. 4841 Pt 1, p. 769-71, Feb 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2829357> >.

EGIDO, E. M. et al. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. **Eur J Endocrinol**, v. 146, n. 2, p. 241-4, Feb 2002. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834435> >.

ENGELSTOFT, M. S. et al. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. **Mol Metab**, v. 2, n. 4, p. 376-92, 2013. ISSN 2212-8778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24327954> >.

ENGUITA-GERMÁN, M.; FORTES, P. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol**, v. 6, n. 10, p. 716-37, Oct 2014a. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349643> >.

EULENFELD, R. et al. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. **Eur J Cell Biol**, v. 91, n. 6-7, p. 486-95, 2012 Jun-Jul 2012. ISSN 1618-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138086> >.

EYENGA, P. et al. Time course of liver nitric oxide concentration in early septic shock by cecal ligation and puncture in rats. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 194-8, Nov 2010. ISSN 1089-8611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547233> >.

FAN, J. et al. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor necrosis factor. **Am J Physiol**, v. 269, n. 5 Pt 2, p. R1204-12, Nov 1995a. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503312> >.

FAN, J. et al. Alterations in hepatic production and peripheral clearance of IGF-I after endotoxin. **Am J Physiol**, v. 269, n. 1 Pt 1, p. E33-42, Jul 1995b. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543247> >.

FAN, J. et al. Differential tissue regulation of insulin-like growth factor-I content and binding proteins after endotoxin. **Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 1685-92, Apr 1994. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511091> >.

FAN, J. et al. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1. **Am J Physiol**, v. 270, n. 3 Pt 2, p. R621-9, Mar 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780229> >.

FERENS, D. M. et al. Functional and in situ hybridization evidence that preganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons express ghrelin receptors. **Neuroscience**, v. 166, n. 2, p. 671-9, Mar 2010. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060438> >.

FOGAÇA, M. V. et al. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 357-65, Apr 2012. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392189> >.

FORTIN, C. F. et al. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. **Shock**, v. 33, n. 4, p. 344-52, Apr 2010. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789465> >.

FOSTER-SCHUBERT, K. E. et al. Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 5, p. 1971-9, May 2008. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198223> >.

FREEMAN, J. N. et al. Chronic central ghrelin infusion reduces blood pressure and heart rate despite increasing appetite and promoting weight gain in normotensive and hypertensive rats. **Peptides**, v. 42, p. 35-42, Apr 2013. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416021> >.

FROST, R. A.; LANG, C. H. Alteration of somatotrophic function by proinflammatory cytokines. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, p. E100-109, 2004. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471789> >.

FRYSTYK, J. Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth Horm IGF Res**, v. 14, n. 5, p. 337-75, Oct 2004. ISSN 1096-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336229> >.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 1980. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831> >.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890489> >.

GAGNERAULT, M. C.; POSTEL-VINAY, M. C.; DARDENNE, M. Expression of growth hormone receptors in murine lymphoid cells analyzed by flow cytofluorometry. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1719-26, May 1996. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612507> >.

GHIMIRE, K. et al. Nitric oxide: what's new to NO? **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 312, n. 3, p. C254-C262, Mar 2017. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27974299> >.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1707-20, May 2006. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697735> >.

GRANADO, M. et al. GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 1, p. E131-41, Jan 2008. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986630> >.

GRANADO, M. et al. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium administration prevents lipopolysaccharide-induced decrease in liver insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 gene expression. **J Endocrinol**, v. 188, n. 3, p. 503-11, Mar 2006. ISSN 0022-0795. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522730> >.

GRANADO, M. et al. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 3, p. E486-92, Mar 2005. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507538> >.

GUO, S. et al. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. **Am J Pathol**, v. 182, n. 2, p. 375-87, Feb 2013. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201091> >.

GUTIERREZ, J. A. et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 17, p. 6320-5, Apr 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443287> >.

HAACK, D. et al. Corticosteroid and corticosteroid metabolite levels in animals immunized against corticosteroids. **J Steroid Biochem**, v. 11, n. 1C, p. 971-80, Jul 1979. ISSN 0022-4731. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/226803> >.

HAMPL, V.; WALTERS, C.L. ARCHER, S.L. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone, in: M. Feelisch and J.S. Stamler (Ed), **Methods in Nitric Oxide Research**, JS Wiley & Sons Ltd, 1996.

HARBRECHT, B. G.; BILLIAR, T. R. The role of nitric oxide in Kupffer cell-hepatocyte interactions. **Shock**, v. 3, n. 2, p. 79-87, Feb 1995. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538434> >.

HASHIMOTO, H. et al. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1638-47, Apr 2007. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255209> >.

HATTORI, N. et al. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 9, p. 4284-91, Sep 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549663> >.

HOLLENBERG, S. M.; CINEL, I. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness-update 2008. **Crit Care**, v. 13, n. 4, p. 218, 2009. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664175> >.

HONEGGER, J. et al. Interleukin-1 beta modulates the acute release of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from rat hypothalamus in vitro, whereas tumor necrosis factor and interleukin-6 have no effect. **Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 1275-82, Sep 1991. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1678697> >.

HOWARD, A. D. et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science**, v. 273, n. 5277, p. 974-7, Aug 1996. ISSN 0036-8075.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8688086> >.

HUANG, Y. et al. Effects of recombinant human growth hormone on rat septic shock with intraabdominal infection by *E. coli*. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 6, p. 1134-7, Dec 2002. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12439940> >.

HUNNINGHAKE, G. W. et al. Insulin-like growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 4, p. 517-25, Aug 2010. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413631> >.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol**, v. 16, n. 5, p. 448-57, May 2015. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25898198> >.

INCERPI, E. K. et al. Inhibition of endogenous glucocorticoid synthesis aggravates lung injury triggered by septic shock in rats. **Int J Exp Pathol**, v. 96, n. 3, p. 133-9, Jun 2015. ISSN 1365-2613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25664386> >.

INOUE, T. et al. Growth hormone and insulinlike growth factor I enhance host defense in a murine sepsis model. **Arch Surg**, v. 130, n. 10, p. 1115-22, Oct 1995. ISSN 0004-0010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575126> >.

IWAKURA, H. et al. The effects of inflammatory cytokines on the expression of ghrelin. **Endocr J**, v. 64, n. Suppl., p. S25-S26, 2017. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652539> >.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med**, v. 22, n. 2, p. 63-72, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0885-0666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456726> >.

JEEVANANDAM, M. et al. Adjuvant recombinant human growth hormone normalizes plasma amino acids in parenterally fed trauma patients. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 19, n. 2, p. 137-44, 1995 Mar-Apr 1995. ISSN 0148-6071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7609279> >.

KAGEYAMA, K. et al. Ghrelin stimulates corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells. **Stress**, v. 14, n. 5, p. 520-9, Sep 2011. ISSN 1607-8888. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21438782> >.

KHATIB, N. et al. Ghrelin: ghrelin as a regulatory Peptide in growth hormone secretion. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 8, p. MC13-7, Aug 2014. ISSN 2249-782X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25302229> >.

KHOWAILED, A. et al. Effects of ghrelin on sepsis-induced acute kidney injury: one step forward. **Clin Exp Nephrol**, v. 19, n. 3, p. 419-26, Jun 2015. ISSN 1437-7799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002019> >.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656-60, Dec 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604470> >.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physiol Rev**, v. 85, n. 2, p. 495-522, Apr 2005. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788704> >.

KRISHNA, A. Y. et al. Transcription initiation of the rat insulin-like growth factor-I gene in hepatocyte primary culture. **J Endocrinol**, v. 151, n. 2, p. 215-23, Nov 1996. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8958781> >.

LANDGRAF, M. A. et al. Leptin downregulates LPS-induced lung injury: role of corticosterone and insulin. **Cell Physiol Biochem**, v. 33, n. 3, p. 835-46, 2014. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685581> >.

LANG, C. H. et al. Role of central IL-1 in regulating peripheral IGF-I during endotoxemia and sepsis. **Am J Physiol**, v. 274, n. 4 Pt 2, p. R956-62, Apr 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575956> >.

LANGE, M. et al. Combined neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibition in ovine acute lung injury. **Crit Care Med**, v. 37, n. 1, p. 223-9, Jan 2009. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050630> >.

LEE, P. D. et al. Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 216, n. 3, p. 319-57, Dec 1997. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9402139> >.

LEVY, B. et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. **Intensive Care Med**, v. 36, n. 12, p. 2019-29, Dec 2010. ISSN 1432-1238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20862451> >.

LI, B. et al. Ghrelin protects alveolar macrophages against lipopolysaccharide-induced apoptosis through growth hormone secretagogue receptor 1a-dependent c-Jun N-terminal kinase and Wnt/ β -catenin signaling and suppresses lung inflammation. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 203-17, Jan 2015. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25337654> >.

LI, W. et al. Ghrelin protects against nucleus pulposus degeneration through inhibition of NF- κ B signaling pathway and activation of Akt signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 54, p. 91887-91901, Nov 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29190883> >.

LI, Y. et al. Administration of ghrelin improves inflammation, oxidative stress, and apoptosis during and after non-alcoholic fatty liver disease development. **Endocrine**, v. 43, n. 2, p. 376-86, Apr 2013. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843123> >.

LI, Y. et al. Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 6, p. G1350-8, Jun

2006. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469825> >.

LIAO, W.; RUDLING, M.; ANGELIN, B. Contrasting effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the biological activities of endotoxin in the rat. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 289-95, Jan 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977416> >.

LIN, Y. et al. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. **Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 977-82, May 2004. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993197> >.

LIU, Z. et al. Growth hormone increases circulating neutrophil activation and provokes lung microvascular injury in septic peritonitis rats. **J Surg Res**, v. 105, n. 2, p. 195-9, Jun 2002. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121707> >.

LIVINGSTONE, C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. **Clin Sci (Lond)**, v. 125, n. 6, p. 265-80, Sep 2013. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721057> >.

LÓPEZ-CALDERÓN, A.; SOTO, L.; MARTÍN, A. I. Chronic inflammation inhibits GH secretion and alters the serum insulin-like growth factor system in rats. **Life Sci**, v. 65, n. 20, p. 2049-60, 1999. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579459> >.

MADUZIA, D. et al. The influence of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 66, n. 6, p. 875-85, Dec 2015. ISSN 1899-1505. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26769837> >.

MANO-OTAGIRI, A. et al. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. **J Endocrinol**, v. 201, n. 3, p. 341-9, Jun 2009. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351665> >.

MAO, Y. et al. Ghrelin Attenuated Lipotoxicity via Autophagy Induction and Nuclear Factor- κ B Inhibition. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, n. 2, p. 563-76, 2015a. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26329041> >.

MAO, Y. et al. Excessive sympathoactivation and deteriorated heart function after myocardial infarction in male ghrelin knockout mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 5, p. 1854-63, May 2013. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23515286> >.

MAO, Y. et al. Ghrelin reduces liver impairment in a model of concanavalin A-induced acute hepatitis in mice. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 5385-96, 2015b. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26451091> >.

MARTELLI, D.; MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. **Auton Neurosci**, v. 182, p. 65-9, May 2014. ISSN 1872-

7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411268> >.

MATSUMURA, K. et al. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. **Hypertension**, v. 40, n. 5, p. 694-9, Nov 2002. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411464> >.

MAXIME, V.; LESUR, O.; ANNANE, D. Adrenal insufficiency in septic shock. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 1, p. 17-27, vii, Mar 2009. ISSN 1557-8216. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19186278> >.

MCCANN, S. M. et al. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 4-18, 2000. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268367> >.

MCCANN, S. M. et al. Role of nitric oxide in the neuroendocrine response to cytokines. **Front Horm Res**, v. 29, p. 117-29, 2002. ISSN 0301-3073. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11789346> >.

MIHARA, M. et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, n. 4, p. 143-59, Feb 2012. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029668> >.

MIKSA, M. et al. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine. **Front Biosci**, v. 10, p. 2217-29, Sep 2005. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970488> >.

MOHN, C. E. et al. The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 17, p. 6213-8, Apr 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837925> >.

MOUTOUSSAMY, S.; KELLY, P. A.; FINIDORI, J. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. **Eur J Biochem**, v. 255, n. 1, p. 1-11, Jul 1998a. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692895> >.

MURIEL, P. Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. **J Appl Toxicol**, v. 20, n. 3, p. 189-95, 2000 May-Jun 2000. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797471> >.

MURRAY, P. G.; HIGHAM, C. E.; CLAYTON, P. E. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-GH axis: the past 60 years. **J Endocrinol**, v. 226, n. 2, p. T123-40, Aug 2015. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26040485> >.

MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. **Mol Metab**, v. 4, n. 6, p. 437-60, Jun 2015. ISSN 2212-8778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26042199> >.

NAGAYA, N. et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 5, p. R1483-7, May

2001. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294772> >.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 23, n. 1, p. 41-66, Mar 2011. ISSN 1558-3481. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316567> >.

NEMOTO, T. et al. The effects of ghrelin/GHSs on AVP mRNA expression and release in cultured hypothalamic cells in rats. **Peptides**, v. 32, n. 6, p. 1281-8, Jun 2011. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514337> >.

NESSELER, N. et al. Clinical review: The liver in sepsis. **Crit Care**, v. 16, n. 5, p. 235, Oct 2012. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23134597> >.

NUNES, M. Hipotálamo endócrino. In: AIRES, M. **Fisiologia**. 4rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

O'DWYER, S. T. et al. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. **Arch Surg**, v. 123, n. 12, p. 1459-64, Dec 1988. ISSN 0004-0010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3142442> >.

ONENLI-MUNGAN, N. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 levels and their relation to survival in children with bacterial sepsis and septic shock. **J Paediatr Child Health**, v. 40, n. 4, p. 221-6, Apr 2004. ISSN 1034-4810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009554> >.

ORTEGA MATEO, A.; AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. **Pharmacol Res**, v. 42, n. 5, p. 421-7, Nov 2000. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023703> >.

OSTERSTOCK, G. et al. Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9159, Feb 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20161791> >.

PAO, C. I. et al. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein 1 gene transcription by hormones and provision of amino acids in rat hepatocytes. **Mol Endocrinol**, v. 7, n. 12, p. 1561-8, Dec 1993. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511786> >.

PAPASTATHI, C. et al. Insulin-like Growth Factor I and its binding protein 3 in sepsis. **Growth Horm IGF Res**, v. 23, n. 4, p. 98-104, Aug 2013. ISSN 1532-2238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611528> >.

PARRATT, J. R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **J Antimicrob Chemother**, v. 41 Suppl A, p. 31-9, Jan 1998. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511084> >.

PAVLOV, V. A. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**, v. 9, n. 5-8, p. 125-34, 2003 May-Aug 2003. ISSN

1076-1551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14571320> >.

PEISEN, J. N. et al. Endotoxin-induced suppression of the somatotrophic axis is mediated by interleukin-1 beta and corticotropin-releasing factor in the juvenile rat. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3378-90, Aug 1995. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628373> >.

PRENZLER, N. K. et al. Obesity influences the food consumption and cytokine pattern in ghrelin-treated endotoxemic rats. **Life Sci**, v. 81, n. 1, p. 80-7, Jun 2007. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532346> >.

PRIEGO, T. et al. Endotoxin at low doses stimulates pituitary GH whereas it decreases IGF-I and IGF-binding protein-3 in rats. **J Endocrinol**, v. 179, n. 1, p. 107-17, Oct 2003. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529571> >.

PRIEGO, T. et al. Glucocorticoids are not necessary for the inhibitory effect of endotoxic shock on serum IGF-I and hepatic IGF-I mRNA. **J Endocrinol**, v. 172, n. 3, p. 449-56, Mar 2002. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874693> >.

PRIEGO, T. et al. NO plays a role in LPS-induced decreases in circulating IGF-I and IGFBP-3 and their gene expression in the liver. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 1, p. E50-6, Jan 2004. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129855> >.

PRIEGO, T. et al. Endotoxin administration increases hypothalamic somatostatin mRNA through nitric oxide release. **Regul Pept**, v. 124, n. 1-3, p. 113-8, Jan 2005. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544848> >.

PÖYKKÖ, S. M. et al. The negative association between plasma ghrelin and IGF-I is modified by obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 48, n. 2, p. 309-16, Feb 2005. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688209> >.

QIU, H. et al. Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e40019, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22768201> >.

RAJAN, D. et al. Human ghrelin protects animals from renal ischemia-reperfusion injury through the vagus nerve. **Surgery**, v. 151, n. 1, p. 37-47, Jan 2012. ISSN 1532-7361. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21943641> >.

REIMER, M. K.; PACINI, G.; AHRÉN, B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 916-21, Mar 2003. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586768> >.

RETTORI, V. et al. Role of nitric oxide in control of growth hormone release in the rat. **Neuroimmunomodulation**, v. 1, n. 3, p. 195-200, 1994 May-Jun 1994. ISSN 1021-7401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489334> >.

REZAEIAN, F. et al. Ghrelin protects musculocutaneous tissue from ischemic necrosis by improving microvascular perfusion. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 3, p. H603-10, Feb 2012. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159999> >.

ROCHA, N. N. et al. Ghrelin therapy improves lung and cardiovascular function in experimental emphysema. **Respir Res**, v. 18, n. 1, p. 185, Nov 2017. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29100513> >.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 31, p. 11008-13, Aug 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669662> >.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. Cholinergic control of inflammation. **J Intern Med**, v. 265, n. 6, p. 663-79, Jun 2009. ISSN 1365-2796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19493060> >.

ROZARIO KS, LLOYD C, RYAN F. GH and IGF-1 Physiology In Childhood. [Updated 2015 Nov 20]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. **Endotext [Internet]**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343487/>

RUSSELL, J. A.; RUSH, B.; BOYD, J. Pathophysiology of Septic Shock. **Crit Care Clin**, v. 34, n. 1, p. 43-61, Jan 2018. ISSN 1557-8232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29149941> >.

SAIA, R. S. et al. Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. **Shock**, v. 39, n. 1, p. 104-13, Jan 2013. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23247127> >.

SAKATA, I. et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. **Peptides**, v. 23, n. 3, p. 531-6, Mar 2002. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836003> >.

SAMSTEIN, B. et al. IL-6 stimulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 production. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 228, n. 2, p. 611-5, Nov 1996. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8920958> >.

SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, n. 5, p. 475-87, Oct 2015. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26189695> >.

SCHMITZ, D. et al. Survival and cellular immune functions in septic mice treated with growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I). **Growth Horm IGF Res**, v. 18, n. 3, p. 245-52, Jun 2008. ISSN 1096-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023601> >.

SCHUETZ, P. et al. Circulating levels of GH predict mortality and complement prognostic scores in critically ill medical patients. **Eur J Endocrinol**, v. 160, n. 2, p. 157-63, Feb 2009. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022915> >.

SCHWENKE, D. O. et al. One dose of ghrelin prevents the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone after myocardial infarction. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2436-43, May 2012. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434083> >.

SHUMATE, M. L. et al. Interleukin-1 inhibits the induction of insulin-like growth factor-I by growth hormone in CWSV-1 hepatocytes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 289, n. 2, p. G227-39, Aug 2005. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831712> >.

SIEGL, D. et al. The effect of ghrelin upon the early immune response in lean and obese mice during sepsis. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122211, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25844479> >.

SOEKI, T. et al. Ghrelin protects the heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin-43 protein. **Heart Vessels**, v. 28, n. 6, p. 795-801, Nov 2013. ISSN 1615-2573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494606> >.

SOTO, L. et al. Effects of endotoxin lipopolysaccharide administration on the somatotrophic axis. **J Endocrinol**, v. 159, n. 2, p. 239-46, Nov 1998. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9795364> >.

SUDAR, E. et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase activity/expression in rat hearts from ghrelin-treated rats. **J Physiol Biochem**, v. 67, n. 2, p. 195-204, Jun 2011. ISSN 1877-8755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107779> >.

SUN, N. et al. Ghrelin attenuates brain injury in septic mice via PI3K/Akt signaling activation. **Brain Res Bull**, v. 124, p. 278-85, 06. 2016. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27288247> >.

SZABO, G. et al. Gut-liver axis and sensing microbes. **Dig Dis**, v. 28, n. 6, p. 737-44, 2010. ISSN 1421-9875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525758> >.

SZABÓ, C.; MÓDIS, K. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. **Shock**, v. 34 Suppl 1, p. 4-14, Sep 2010. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523270> >.

SZELÉNYI, J.; KISS, J. P.; VIZI, E. S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice. **J Neuroimmunol**, v. 103, n. 1, p. 34-40, Feb 2000. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674987> >.

TACKE, F.; LUEDDE, T.; TRAUTWEIN, C. Inflammatory pathways in liver

homeostasis and liver injury. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 36, n. 1, p. 4-12, Feb 2009. ISSN 1080-0549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600481> >.

TAKALA, J. et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. **N Engl J Med**, v. 341, n. 11, p. 785-92, Sep 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477776> >.

TANNENBAUM, G. S.; EPELBAUM, J.; BOWERS, C. Y. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. **Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 967-74, Mar 2003. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586774> >.

TANNENBAUM, G. S. et al. Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4420-3, Oct 1998. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751527> >.

THISSEN, J. P.; VERNIERS, J. Inhibition by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha of the insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid response to growth hormone in rat hepatocyte primary culture. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1078-84, Mar 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048612> >.

TOLLE, V. et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1353-61, Apr 2002. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897692> >.

TOLLE, V. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 1, p. 54-61, Jan 2001. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11174017> >.

TOUSOULIS, D. et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 10, n. 1, p. 4-18, Jan 2012. ISSN 1875-6212. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112350> >.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Clin Invest**, v. 117, n. 2, p. 289-96, Feb 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17273548> >.

TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 443-52, Dec 2007. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17903207> >.

URONEN-HANSSON, H. et al. Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood. **Growth Horm IGF Res**, v. 13, n. 5, p. 282-6, Oct 2003. ISSN 1096-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932750> >.

VALDÉS-FERRER, S. I. et al. High-mobility group box 1 mediates persistent splenocyte priming in sepsis survivors: evidence from a murine model. **Shock**, v. 40, n. 6, p. 492-5, Dec 2013. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089009> >.

VILA, G. et al. Bacterial endotoxin induces biphasic changes in plasma ghrelin in healthy humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 10, p. 3930-4, Oct 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666475> >.

VILA, G. et al. Systemic administration of oxytocin reduces basal and lipopolysaccharide-induced ghrelin levels in healthy men. **J Endocrinol**, v. 203, n. 1, p. 175-9, Oct 2009. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587265> >.

VOERMAN, B. J. et al. Effects of human growth hormone in critically ill nonseptic patients: results from a prospective, randomized, placebo-controlled trial. **Crit Care Med**, v. 23, n. 4, p. 665-73, Apr 1995. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7712756> >.

VOERMAN, H. J. et al. Effects of recombinant human growth hormone in patients with severe sepsis. **Ann Surg**, v. 216, n. 6, p. 648-55, Dec 1992. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1466618> >.

WANG, D. W.; YIN, Y. M.; YAO, Y. M. Vagal Modulation of the Inflammatory Response in Sepsis. **Int Rev Immunol**, v. 35, n. 5, p. 415-433, 09 2016. ISSN 1563-5244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27128144> >.

WANG, G. et al. Ghrelin prevents neuronal apoptosis and cognitive impairments in sepsis-associated encephalopathy. **Neuroreport**, v. 22, n. 18, p. 959-64, Dec 2011. ISSN 1473-558X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22027512> >.

WANG, P.; LI, N.; LI, J. S. Mechanism of growth hormone insensitivity induced by endotoxin. **Acta Pharmacol Sin**, v. 23, n. 1, p. 16-22, Jan 2002a. ISSN 1671-4083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860731> >.

WANG, P. et al. The role of endotoxin, TNF-alpha, and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 3, p. 531-6, Jun 2002b. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12046086> >.

WANG, Q. et al. Ghrelin protects the heart against ischemia/reperfusion injury via inhibition of TLR4/NLRP3 inflammasome pathway. **Life Sci**, v. 186, p. 50-58, Oct 2017. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28782532> >.

WANG, Y. et al. Effects and mechanisms of ghrelin on cardiac microvascular endothelial cells in rats. **Cell Biol Int**, v. 35, n. 2, p. 135-40, Feb 2011. ISSN 1095-8355. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843299> >.

WARWICK-DAVIES, J.; LOWRIE, D. B.; COLE, P. J. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of

H2O2. **J Immunol**, v. 154, n. 4, p. 1909-18, Feb 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836772> >.

WASEEM, T. et al. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. **Surgery**, v. 143, n. 3, p. 334-42, Mar 2008. ISSN 1532-7361. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291254> >.

WEI, H. et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and prevents cognitive impairment in septic rats. **Crit Care Med**, v. 43, n. 5, p. e143-50, May 2015. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25756415> >.

WILLIAMS, D. L. et al. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 2765-7, Jul 2003. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810528> >.

WOLF, J.; ROSE-JOHN, S.; GARBERS, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. **Cytokine**, v. 70, n. 1, p. 11-20, Nov 2014. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24986424> >.

WOLF, M. et al. Proinflammatory cytokines interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. **Eur J Endocrinol**, v. 135, n. 6, p. 729-37, Dec 1996. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9025720> >.

WREN, A. M. et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4325-8, Nov 2000. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089570> >.

WU, R. et al. Ghrelin down-regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve. **Ann Surg**, v. 245, n. 3, p. 480-6, Mar 2007a. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435556> >.

WU, R. et al. Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e2026, Apr 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431503> >.

WU, R. et al. Orexigenic hormone ghrelin ameliorates gut barrier dysfunction in sepsis in rats. **Crit Care Med**, v. 37, n. 8, p. 2421-6, Aug 2009a. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531942> >.

WU, R. et al. Ghrelin improves tissue perfusion in severe sepsis via downregulation of endothelin-1. **Cardiovasc Res**, v. 68, n. 2, p. 318-26, Nov 2005. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16018991> >.

WU, R. et al. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 8, p. 805-13, Oct 2007b. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626913> >.

WU, R. et al. Upregulation of cardiovascular ghrelin receptor occurs in the hyperdynamic phase of sepsis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 3, p. H1296-302, Sep 2004. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155262> >.

WU, R. et al. Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 6, p. E1697-702, Dec 2007c. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911350> >.

WU, R. et al. Ghrelin hyporesponsiveness contributes to age-related hyperinflammation in septic shock. **Ann Surg**, v. 250, n. 1, p. 126-33, Jul 2009b. ISSN 1528-1140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561473> >.

XU, L. et al. IGF-1 may predict the severity and outcome of patients with sepsis and be associated with microRNA-1 level changes. **Exp Ther Med**, v. 14, n. 1, p. 797-804, Jul 2017. ISSN 1792-0981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28673002> >.

XU, X. et al. Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 4183-92, Aug 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450953> >.

YANG, J. et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 387-96, Feb 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267071> >.

YANG, S. et al. Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 6, p. G1274-81, Dec 2000. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093951> >.

YANG, S. et al. Norepinephrine-induced hepatocellular dysfunction in early sepsis is mediated by activation of alpha2-adrenoceptors. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, n. 4, p. G1014-21, Oct 2001. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557522> >.

YI, C. et al. Beneficial effect of recombinant human growth hormone on the intestinal mucosa barrier of septic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 1, p. 41-8, Jan 2007. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224995> >.

YILMAZ, Z.; ILCOL, Y. O.; ULUS, I. H. Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. **Crit Care Med**, v. 36, n. 3, p. 828-33, Mar 2008. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431270> >.

YUMET, G. et al. Hepatic growth hormone resistance during sepsis is associated with increased suppressors of cytokine signaling expression and impaired growth hormone signaling. **Crit Care Med**, v. 34, n. 5, p. 1420-7, May 2006. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540952> >.

YUMET, G. et al. Tumor necrosis factor mediates hepatic growth hormone resistance during sepsis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 3, p. E472-81, Sep 2002. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169440> >.

ZARKESH-ESFAHANI, S. H. et al. High-dose growth hormone does not affect proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interferon- γ) release from activated peripheral blood mononuclear cells or after minimal to moderate surgical stress. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 9, p. 3383-90, Sep 2000. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999838> >.

ZENG, M. et al. Ghrelin attenuates sepsis-associated acute lung injury oxidative stress in rats. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 683-90, Apr 2015. ISSN 1573-2576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037094> >.

ZHAO, Y. et al. Distinct mechanisms of induction of hepatic growth hormone resistance by endogenous IL-6, TNF- α , and IL-1 β . **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 307, n. 2, p. E186-98, Jul 2014. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895283> >.

APÊNDICE

APÊNDICE

ROLE OF GHRELIN ON GROWTH HORMONE (GH) - INSULINE LIKE GROWTH FACTOR -1 (IGF-1) AXIS DURING ENDOTOXEMIA

²FELIPE FAIM MSc; ²PATRICIA PASSAGLIA MSc., ¹ANGELITA MARIA STABILE
Ph.D; ¹MARCELO E. BATALHAO MSc.; ^{1,2}EVELIN CAPELLARI CARNIO Ph.D

¹Departamento de Enfermagem Geral e Especializada, Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto, ²Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Running head: Ghrelin and GH-IGF-1 axis during endotoxemia

Key words: lipopolysaccharide, cytokines, inflammation; sepsis, liver

Corresponding author.

Evelin C. Carnio RN PhD

Departamento de Enfermagem Geral e Especializada,
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP.
14040-902-Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Fax: 55 16 3633-3271 Phone: 55 16 3602-4768

Email: carnioec@eerp.usp.br

Abstract

Background: Inflammation leads to changes in growth hormone (GH) / insulin-like growth factor-1 (IGF-1) axis. It has been reported that pro-inflammatory cytokines may be responsible for this alteration.

Ghrelin is a hormone, which is known for its ability to release GH, and has an orexigenic effect and antiinflammatory properties.

The hypothesis of this study is that treatment with ghrelin may attenuate the change on GH/IGF-1 axis by reducing pro-inflammatory mediators as nitric oxide, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6 during endotoxemia induced by lipopolissacharide (LPS).

Results: Intraperitoneal LPS administration induced a decrease in IGF-1 and GH serum levels, characterizing the change of GH / IGF-1 axis. Intravenously treatment with ghrelin attenuated the decrease of serum levels of IGF-1 induced by LPS. LPS induced increase in serum nitrate and proinflammatory cytokines as TNF- α , IL1- β , IL6. In liver, LPS also led to increased cytokines TNF- α , IL1- β and IL6. Treatment with ghrelin attenuated the increase in pro-inflammatory mediators nitrate, TNF- α , IL1- β and IL-6 induced by LPS administration in both blood and liver.

Conclusion: Treatment with ghrelin attenuated the decrease in serum levels of IGF-1 in endotoxemic animals, suggesting a possible improvement in hepatic GH insensitivity.

Introduction

Growth hormone (GH) is synthesized by somatotrophs in the anterior pituitary and is regulated by several factors. Among the hormonal factors, releasing hormone (GHRH) promotes the synthesis and release of GH [1], while somatostatin (SS) inhibits its release, but not synthesis [2]. Ghrelin hormone also induces GH release by direct action on the pituitary gland [3,4], by stimulating the release of GHRH [5,6,7] and antagonize the effects of somatostatin [8,9].

Since GH induces the synthesis of insulin-like growth factor I (IGF-1), and both are anabolic hormones, GH has been used in medical practice to reverse the catabolic state found in critically ill patients [10,11,12]. However, a clinical trial conducted by Takala and collaborators [13] showed that treatment with high doses of GH increased the mortality in critically ill patients. In patients treated with GH it was observed an elevation in incidence of sepsis as well as in death due to multiple organ failure and septic shock. This fact leads the authors to suggest an action of GH on the immune system. Additionally, in a different study with patients at different stages of sepsis, it was observed an elevation in plasma GH levels increasing the severity of disease. In addition, GH plasma levels were seven times higher in patients who died from sepsis [14]. The same relationship between the increase in plasma GH levels and increased mortality were found in clinical studies of septic children [15,16]. Since circulating GH levels were higher, it was expected that IGF-1 levels were also high, once GH is able to induce the synthesis of IGF-1. However, in children who did not survive were observed lower plasma IGF-1 levels. The increase in GH was accompanied by a decrease of IGF-1, which may suggest a resistance to GH, resulting in changes on GH / IGF-1 axis. GH / IGF-1 axis may be altered in different inflammatory conditions. Resistance to GH is characterized by low concentration of circulating IGF-1 and the absence or decrease in response to stimulation with GH. In humans [14-17] and in sheep [18], resistance to GH observed during inflammatory conditions is accompanied by high circulating levels of GH. In rats, the resistance to GH induced by endotoxemia or sepsis may occur accompanied by increased [19-22], decreased [21-27] or no change in circulating levels of GH [23,27-30].

The understanding of the development of resistance to GH in experimental endotoxemia model is not fully understood and seems to be multifactorial. As the liver is the main source of circulating IGF-1, the attention is turning to that organ. Among the possible causes for this resistance, strong evidence points to the involvement of

pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL) -1 β and IL-6 in modulating signaling via JAK / STAT5, gene expression and synthesis of IGF-1, insulin growth factor binding proteins (IGFBP's) and suppressive of cytokine signalling (SOCS) protein [19,20,24,29-40].

Grelin is a orexigenic hormone and is also known for its ability to release GH [3,4,8] Ghrelin is a peptide hormone of 28 amino acids which serine at position three undergoes modification by n-octanoic acid [3]. This peptide is produced primarily by the stomach and the best-known biological effects are attributed to its interaction with the secretagogue receptor growth hormone subtype 1a (GHSR-1a) [41]. In addition to the ability to release GH and its orexigenic effect, several studies have shown the anti-inflammatory properties of ghrelin in different experimental models such as colitis [42,43], non-alcoholic fatty liver disease [44,45], hepatitis [46], cerebral ischemia [47] and polymicrobial sepsis [48-54]. In these inflammatory models, ghrelin attenuated the increase in cell injury markers aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT), and attenuated the increase in pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL1- β and IL6. Thus, the hypothesis of this study was that ghrelin administration might attenuate inflammation caused by administration of lipopolysaccharide (LPS) in rats, favouring an increase in circulating levels of IGF-1.

Materials and methods

Animals

Experiments were performed on adult male *Wistar* rats weighing 250-300 g. The animals were housed in a ventilated and controlled temperature chamber (25 $\pm$ 2oC) and exposed to a daily 12:12 h light-dark cycle (lights on at 0700 AM). They were housed in polypropylene cages of 3-4 rats per cage and given food and water ad libitum before beginning the experiment.

All procedures were conducted in accordance with the Ethics Committee in the Use of Animals , University of São Paulo, São Paulo, Brazil (protocol No: 14.1.912.53.6).

Drugs

LPS from *Escherichia coli* serotype 0111: B4 was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Rat ghrelin was obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Ketamine hydrochloride (Ketamina.Agener®). Xylazine (Dopaser ®). All drugs were

diluted in sterile saline.

Cannulation of the external jugular vein

The day before the experiments, the animals received anaesthesia with ketamine and xylazine (75mg / kg and 10mg / kg i.p., respectively; 1ml / kg) to achieve intravenous access (iv). A sylastic catheter (Dow Corning, Midland, Michigan) was inserted into the right external jugular vein, fixed with suture and exteriorized in the dorsal cervical region to ghrelin or saline administration. After surgery, it was allowed a period of 1 day recovery, being kept in cage boxes with free access to water and feed.

Experimental protocols

Animals were divided into 4 experimental groups: 1) control group received sterile saline (0.9% NaCl ip and 0.9% NaCl ev); 2) Ghrelin group: received ghrelin (0.9% NaCl ip and ghrelin 15nmol/kg, ev); 3) LPS group: received (LPS 5 mg / kg, i.p and 0.9% NaCl i.v); 4) ghrelin + LPS group: received (LPS 5 mg / kg, ip and ghrelin 15nmol / kg, i.v). The administration of LPS and/or ghrelin occurred at the same time, being considered the beginning of the experiment (time zero). The animals had free access to water and food after administration of drugs. They were decapitated at 2h, 6h and 12h and trunk blood collected for measurements of GH, IGF-1, ghrelin, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitrate. Also, the liver was collected for dosages of TNF- α , IL-1 β and IL-6. All samples were kept at -80 ° C until analysis.

For survival assessment, the animals were kept in isolated cages with free access to water and food were observed for 72 hours.

Nitric oxide measurement by chemiluminescence

In order to measure plasma nitrate it was used chemiluminescence NO / ozone method (Hampl, 1996). Briefly, samples were deproteinized with 100 μ l of absolute ethanol at 4 ° C for 30 minutes. Then the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. After deproteinization, 5 μ l of samples were placed to react with vanadium trichloride (VCl₃), which converts nitrate to NO. NO is then loaded into the chamber Sievers chemiluminescence NO analyzer (NOA 280i model, Boulder, USA). The NO values were established from a standard curve of sodium nitrate solution.

TNF- α , IL-1 β , IL-6, GH, IGF-1 and ghrelin determination.

Serum TNF- α , IL-1 β , IL-6, GH, IGF-1 and TNF- α , IL-1 β , IL-6 liver levels were measured by specific ELISA kits according to the instructions of the manufacturers (BD Bioscience, San Diego, CA). Plasma ghrelin and serum GH levels were also determined by Elisa (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Statistical analysis

Results are represented as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Values were considered significant when $P < 0.05$. Survival was estimated by the Kaplan-Meier method and compared by log-rank test.

Results

LPS administration induced an increase in serum TNF- α in all evaluated times (Fig. 1A-C), with the highest values found in 2h. Treatment with ghrelin reduced the TNF- α serum peak observed after 2 hours of LPS injection (Fig. 1A) with no changes in serum concentrations at the following times (Fig. 1B-C). LPS administration induced an elevation in serum IL-1 β and IL-6 (Fig. 2A-C and 3A-C, respectively) at all times analysed and the highest values was observed after 2h LPS administration. Ghrelin administration attenuated the increase in serum IL-1 β and IL-6 induced by LPS only after 12h of LPS injection. (Figs. 2C and 3C, respectively). Following LPS administration, nitrate levels, an indirect marker of nitric oxide (NO) production, increased in all analysed time (Fig. 4A-C). Ghrelin administration was able to reduce plasma nitrate levels after 12h of LPS administration (Fig. 4C), the time that nitrate was higher in endotoxemic animals.

LPS administration increased hepatic concentration of TNF- α only at 2h interval and treatment with ghrelin reduced this increase (Fig. 1D). Increased hepatic levels of IL-1 β and IL-6 was observed after LPS administration in all analysed intervals (Fig. 2D-F and 3D-F), and the highest values were found in 2h. Ghrelin attenuated the hepatic increase in 2h and 12h (Figure 2D and F; 3D and F, respectively), although in 12 hours the values were already reduced in the animals that received LPS.

Administration of ghrelin *per se* increased plasma ghrelin levels at 2h, 6h and 12h (Fig. 5A-C). The increase in plasma ghrelin at 2h (Fig. 5A) was accompanied by a

reduction in serum IGF-1 (Figure 5D). Serum IGF-1 levels at 6h and 12h remained close to control animals levels (Fig. 5E-F). Ghrelin administration decreased serum GH levels at 12h (Fig. 5I). In the meantime, the rats treated with ghrelin and control group showed great variability in GH values, increasing the average standard deviation.

After 6h of LPS administration we observed a drastic reduction in plasma ghrelin levels so we were not able to detect by ELISA kit (Fig. 5B). In 12h, ghrelin levels was detected, but were significantly lower when compared to the control group (Fig. 5C). LPS lowered the serum concentration of IGF-1 at 6h and 12h (Fig. 5E-F) and treatment with ghrelin attenuated this reduction observed at 12 hours (Fig. 5F). The reduction in serum GH induced by LPS was observed in all the analysed time (Fig. 5G-I) and treatment with ghrelin inhibited the drop in the range of 2 hours (Figure 5G).

LPS administration increased mortality by 10%. No animals subjected to endotoxemia and treated with ghrelin died during the experiment.

Discussion

This study shows for the first time that ghrelin administration was able to induce elevation in serum IGF-1 level during endotoxemia. Ghrelin is a peptide hormone produced primarily by X/A-like cells in stomach [41]. It is a hormone known to stimulate GH release [3,4,8] and having orexigenic effect [5,55]. It has a half-life of approximately 30 minutes in rats [56] and 10 minutes in man [57]. In order to test the kinetics of ghrelin administration in serum levels we used ghrelin administration and followed serum concentration for 2, 6 and 12 hours. In our study, after ghrelin administration we observed an elevation in ghrelin serum levels which last until the sixth hour. However, after 12 hours of experiment we found a significant decrease when compared to saline treated animals. Our data are consistent with the findings of Tolle and collaborators [56]. They found that ghrelin when administered intravenously was able to increased food intake, which was reverted after a period of 9 hours of experiment.

In our study, we observed that endotoxemia induced a decrease in ghrelin serum levels, which last for 6 hours. The concentration of circulating ghrelin during endotoxemia or polymicrobial peritonitis seems to be species dependent. Under these conditions, there is an increase in circulating ghrelin levels in dogs [58], biphasic response in humans - with an initial increase followed by a decrease in plasma levels

[59,60]- and decreased in rats [51,61,62]. In our model, the treatment with ghrelin, however, attenuated the decrease observed in endotoxemic animals.

LPS is a cell wall component of Gram-negative bacteria. Once recognized by pattern recognition receptors initiate the inflammatory response defense [63]. Binding of LPS to LPS binding protein (LBP) and CD-14 receptor molecule form a ternary complex capable of binding to the toll-like receptor 4 (TLR4) / MD2, culminating in the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B), MAPK and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / AKT [64]. The NF- κ B activation results in the transcription of several genes. As a result of transcription of NF- κ B, we highlight the acute phase proteins, TNF- α cytokines IL-1 β , IL-6 and nitric oxide synthase (iNOS), the latter elevating the levels of NO [63]. TNF- α and IL-1 β also lead to activation of NF- κ B [65,66].

LPS administration results in activation of different cell types, including Kupffer cells [67,68]. Kupffer cells are resident macrophages of the liver. They constitute the larger pool of body macrophages, and once activated, synthesize large amounts of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO [69]. Liver injury impairs essential functions in the body, such as coagulation, metabolism and immunity.

As expected, infusion of LPS in our model caused increase in serum pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 as well as NO. Similarly, LPS increased liver levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6. The treatment with ghrelin was able to significantly lower peak TNF- α in plasma and liver at 2h intervals after LPS administration. Although ghrelin has attenuated the increase of IL-1 β and IL-6 in liver at 2h and 12h, we only observed serum reduction of these cytokines in 12h with ghrelin treatment. This result demonstrates the production of other local cytokine production, for example spleen cells, endothelial cells and peritoneal macrophages. Our results are in agreement with other studies showing anti-inflammatory properties of ghrelin. Many studies show that anti-inflammatory effects of ghrelin are dependent on the vagus nerve, as vagotomy abolish these effects [47,49,52,54,70,71]. In fact, GHSR is expressed in the nucleus of the solitary tract (NTS) and the vagus dorsal motor nucleus (DMV) [72], location where most of the vagal efferent originate. Still, Date and colleagues [5] found that 45% of the cell bodies of the nodose ganglion of mice have receptors for ghrelin. Moreover, ghrelin administration increases c-fos marking in the NTS and DMV [73,74]. The vagus nerve stimulation leads to the activation of anti-inflammatory cholinergic pathway, in which the release of acetylcholine plays a key role [75-78]. The anti-inflammatory actions of ghrelin may also come from the interaction with the

sympathetic nervous system. Indeed, several studies have shown that ghrelin decreases the activity of the sympathetic nervous system and plasma concentration of noradrenaline. [72,79-85]. The reduction in sympathetic activity by ghrelin may be beneficial because activation of the sympathetic pathway and the subsequent release of noradrenaline may lead to increased proinflammatory cytokines by activation of alpha adrenergic receptors [86,87]. A possible direct effect of ghrelin on immune system cells has also been reported by other researchers. Waseem et al [88] found GHSR-1a in strains of mice macrophages, and treatment with ghrelin attenuated the increase of TNF- α and IL-1 β induced by LPS. The ghrelin receptor present in other macrophage lineage was also observed by Li et al [89].

Although some studies indicate the ability of ghrelin to increase the production of NO [90-94], in our experimental model, ghrelin per se does not change the plasma levels of NO. Zeng et al [95] observed that in systemic inflammation induced by ligation and puncture of the caecum (CLP), treatment with ghrelin attenuated the increase in iNOS gene expression in total lung. However, the same study showed that when alveolar macrophages were isolated, treatment with ghrelin increased gene expression of iNOS. The role of ghrelin in the modulation of NO during endotoxemia is not well described. Granado and colleagues [96] showed that GHRP-2 administration, a synthetic agonist of the ghrelin receptor, decreased in serum 4 hours after LPS administration. In our model, ghrelin administration significantly reduced the rise in plasma concentration of NO induced by LPS in 12h. These data suggest that ghrelin was able to reduce the plasma concentration of NO, which could be due to the reduction of TNF- α and IL-1 β

The decrease of pro-inflammatory mediators TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO favors the liver integrity compromised in highly inflammatory conditions. Treatment with ghrelin has proved beneficial in reducing tissue damage markers such as AST, ALT and lactate in inflammatory conditions such as concavaline A induced hepatitis [46], nonalcoholic fatty liver disease [44], kidney and intestinal ischemia / reperfusion injury [71,52], endotoxemia [97] and CLP [49,98]. Good liver function is important, among other factors, because it is a key component for the proper functioning of GH / IGF-1 axis. In our model of endotoxemia, it was not expected that ghrelin could increase GH during the period of experiment due to the time-course of GH release after administration of ghrelin. Ghrelin has a half-life of 30 minutes in rats [56] and causes rapid GH release. In rats, ghrelin administration increases plasma levels of GH,

causing peak of this hormone between 5 and 20 minutes, with a subsequent decrease and returned to baseline levels within one hour [8,55,99]. Interestingly, two hours after ghrelin administration we observed a reduction in serum IGF-1 levels, which were not followed by changes in plasma GH level. At this time, plasma concentration of ghrelin was still high. A negative correlation between endogenous ghrelin and IGF-1 have been observed in human studies [100,101]. Poykko and collaborators suggested a possible negative feedback effect between IGF and ghrelin. Despite being controlled by various factors such as nutritional status, age and gender, in physiological conditions IGF-1 increases in response to GH [102]. In the present study we observed a decrease in serum GH concentration in 12h without concomitant decrease in serum IGF-1 concentrations in animals that received only ghrelin. However, it is important to note that GH secretion occurs in a pulsatile manner and that between pulses GH is minimal or undetectable, *ie* occurs with great variability during the day [2]. By having a longer half-life and provide more stable blood during the day, IGF-1 is used as an indirect measure of GH levels [103,104]. Thus, the decrease of GH without concomitant decrease in IGF-1 at 12h could be only a characteristic variation of GH.

The administration of LPS in our study reduced the serum levels of IGF-1 and GH in all the intervals. This result is consistent with several other studies in the literature, which show a reduction in circulating levels of IGF-1 and GH in rats after LPS administration [21-27]. The reduction of circulating GH is found in high doses of LPS and may be a consequence of the increase of somatostatin in the hypothalamus [23,105,106]. These data could suggest that in our model we are observing a possible liver GH insensitivity.

We observed that treatment with ghrelin was able to attenuate the IGF-1 serum loss induced by LPS in 12h. The question that rises here is how ghrelin could act in order to modulate the GH insensitivity. Although the mechanisms that trigger hepatic resistance to GH are still controversial, many studies suggest the involvement of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO in the process.

In hepatocyte cultures, TNF- α attenuated the increase in gene expression of IGF-1 and GHR [32,34,20,39,107]. In mice, TNF- α infusion decreased the plasma concentration of GH and IGF-1 as well as gene expression GHR and IGF-1 in liver [24,29]. Treatment with anti-TNF antibody attenuated the decrease in the serum IGF-1 induced by LPS [24]. On the other hand, Colson et al [108] showed that inhibition of TNF- α with pentoxifylline synthesis did not alter the reduced IGF-1 plasma and IGF-1

mRNA in the liver of rats subjected to endotoxemia, suggesting that TNF- α is not participating in hepatic resistance to GH.

Studies using cultures of hepatocytes have shown that IL-1 β shares some mechanisms in common with TNF- α . IL-1 β reduced gene expression of IGF-1 and GHR, both induced by GH [32,34,38,107]. Treatment with IL-1 β receptor antagonists attenuate the changes in GH and IGF-1 in models of endotoxemia and septic shock [19,105,107]. Zhao and collaborators [107] showed that neutralization of TNF- α and IL-1 β in mice subjected to endotoxemia, attenuated the decrease in gene and protein expression of hepatic GHR. As a result, they observed an increase in gene expression of IGF-1.

It has been demonstrated that IL-6 decreased gene expression of IGF-1 induced GH. Denson et al [37] showed that in IL-6 knockout mice, LPS was not able to inhibit activation of STAT5 induced by GH in the liver, suggesting a possible GH hepatic resistance mechanism dependent of IL-6. Corroborating these results, Zhao and collaborators [107] showed that neutralizing IL-6 in mice reversed the increase of SOCS-3 (a protein which is directly related to inhibition of IGF-1 gene transcription) and attenuated the decrease in gene expression of liver IGF-1 induced by LPS. In fact, it has been reported negative correlation between plasma levels of IL-6 and IGF-1 in humans [17] and a positive correlation between IL-6 and SOCS-3 in mice [30].

In our model, treatment with ghrelin decreased the circulating concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6 at different times in serum and liver. Besides the reduction in pro-inflammatory cytokines, we observed that treatment with ghrelin significantly reduced plasma concentration of nitrate. NO is a potent vasodilator [109,110] and its high production observed during endotoxemia is caused by the induction and activation of iNOS [111]. NO quickly reacts with superoxide to form peroxynitrite, contributing to several disease processes. One of peroxynitrite actions is to cause inhibition of critical mitochondrial respiratory chain enzymes, which may lead to apoptosis and necrosis [112]. Thus, the reduction of the high plasma levels of NO during endotoxemia is potentially beneficial to the liver by promoting the improvement in hepatic GH insensitivity. In fact, Priego and colleagues [22] showed that the use of an iNOS inhibitor prevented decrease in serum IGF-1 and gene expression of IGF-1 in the liver induced by endotoxemia.

LPS at a dose used in our study did not significantly increase mortality, however, the increase in serum levels of IGF-1 observed in animals subjected to endotoxemia

after treatment with ghrelin may promote survival. Hunninghake and collaborators [113] showed that treatment with IGF-1 reduces the translocation of intestinal bacteria in mice after intratracheal inoculation of *P. aeruginosa*. Ashare and collaborators [114] also observed that in mice subjected to intratracheal inoculation with *P. aeruginosa*, treatment with IGF-1 reduced the increase of TNF- α and IL-6 in liver, improved hepatic bacterial clearance, attenuated the increase in ALT and lead to increased survival in sepsis. The beneficial effect of treatment with IGF-1 was also reported by Inoue and collaborators [115]. The researchers found that treatment with IGF-1 increased survival in mice subjected to abdominal sepsis. In this study, treatment with IGF-1 in high concentrations decreased bacteria in the liver and blood, besides the reduction of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in plasma.

In summary, treatment with ghrelin attenuated the decrease in serum levels of IGF-1 in endotoxemic animals, suggesting a possible improvement in hepatic GH insensitivity. The exact mechanism by which ghrelin attenuated the decrease of IGF-1 induced by LPS is unclear and more studies need to be performed. However, our results suggest that their anti-inflammatory action, reducing TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO may be involved in this process.

References

1. Ahmed SF, Farquharson C. The effect of GH and IGF1 on linear growth and skeletal development and their modulation by SOCS proteins. *J Endocrinol*. 2010. Sep;206(3):249-59.
2. Rozario KS, Lloyd C, Ryan F. Gh and Igf-1 Physiology in Childhood. 2000.
3. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656-60.
4. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluett-Pajot MT. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*. 2001 Jan;73(1):54-61.
5. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1120-8.

6. Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer LA, Fontanaud P, Molino F, et al. Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS One*. 2010. 5(2):e9159.
7. Murray PG, Higham CE, Clayton PE. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-GH axis: the past 60 years. *J Endocrinol*. 2015. Aug;226(2):T123-40.
8. Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2003 Mar;144(3):967-74.
9. Khatib N, Gaidhane S, Gaidhane AM, Khatib M, Simkhada P, Gode D, et al. Ghrelin: ghrelin as a regulatory Peptide in growth hormone secretion. *J Clin Diagn Res*. 2014. Aug;8(8):MC13-7.
10. Voerman BJ, Strack van Schijndel RJ, Groeneveld AB, de Boer H, Nauta JP, Thijs LG. Effects of human growth hormone in critically ill nonseptic patients: results from a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Crit Care Med*. 1995 Apr;23(4):665-73.
11. Voerman HJ, van Schijndel RJ, Groeneveld AB, de Boer H, Nauta JP, van der Veen EA, et al. Effects of recombinant human growth hormone in patients with severe sepsis. *Ann Surg*. 1992 Dec;216(6):648-55.
12. Jeevanandam M, Ali MR, Holaday NJ, Petersen SR. Adjuvant recombinant human growth hormone normalizes plasma amino acids in parenterally fed trauma patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1995 Mar-Apr;19(2):137-44.
13. Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N Engl J Med*. 1999 Sep 9;341(11):785-92.
14. Schuetz P, Muller B, Nusbaumer C, Wieland M, Christ-Crain M. Circulating levels of GH predict mortality and complement prognostic scores in critically ill medical patients. *Eur J Endocrinol*. 2009 Feb;160(2):157-63.
15. de Groof F, Joosten KF, Janssen JA, de Kleijn ED, Hazelzet JA, Hop WC, et al. Acute stress response in children with meningococcal sepsis: important differences in the growth hormone/insulin-like growth factor I axis between nonsurvivors and survivors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul;87(7):3118-24.

16. Onenli-Mungan N, Yildizdas D, Yapicioglu H, Topaloglu AK, Yuksel B, Ozer G. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 levels and their relation to survival in children with bacterial sepsis and septic shock. *J Paediatr Child Health*. 2004 Apr;40(4):221-6.
17. Papastathi C, Mavrommatis A, Mentzelopoulos S, Konstandelou E, Alevizaki M, Zakynthinos S. Insulin-like Growth Factor I and its binding protein 3 in sepsis. *Growth Horm IGF Res*. 2013. Aug;23(4):98-104.
18. Briard N, Dadoun F, Pommier G, Sauze N, Lebouc Y, Oliver C, et al. IGF-I/IGFBPs system response to endotoxin challenge in sheep. *J Endocrinol*. 2000 Mar;164(3):361-9.
19. Lang CH, Fan J, Cooney R, Vary TC. IL-1 receptor antagonist attenuates sepsis-induced alterations in the IGF system and protein synthesis. *Am J Physiol*. 1996 Mar;270(3 Pt 1):E430-7.
20. Yumet G, Shumate ML, Bryant P, Lin CM, Lang CH, Cooney RN. Tumor necrosis factor mediates hepatic growth hormone resistance during sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Sep;283(3):E472-81.
21. Priego T, Granado M, Ibanez de Caceres I, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Endotoxin at low doses stimulates pituitary GH whereas it decreases IGF-I and IGF-binding protein-3 in rats. *J Endocrinol*. 2003 Oct;179(1):107-17.
22. Priego T, Ibanez de Caceres I, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. NO plays a role in LPS-induced decreases in circulating IGF-I and IGFBP-3 and their gene expression in the liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jan;286(1):E50-6.
23. Soto L, Martin AI, Millan S, Vara E, Lopez-Calderon A. Effects of endotoxin lipopolysaccharide administration on the somatotrophic axis. *J Endocrinol*. 1998 Nov;159(2):239-46.
24. Fan J, Char D, Bagby GJ, Gelato MC, Lang CH. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor necrosis factor. *Am J Physiol*. 1995 Nov;269(5 Pt 2):R1204-12.
25. Fan J, Molina PE, Gelato MC, Lang CH. Differential tissue regulation of insulin-like growth factor-I content and binding proteins after endotoxin. *Endocrinology*. 1994 Apr;134(4):1685-92.
26. Lopez-Calderon A, Soto L, Martin AI. Chronic inflammation inhibits GH secretion and alters the serum insulin-like growth factor system in rats. *Life Sci*. 1999;65(20):2049-60.

27. Defalque D, Brandt N, Ketelslegers JM, Thissen JP. GH insensitivity induced by endotoxin injection is associated with decreased liver GH receptors. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1):E565-72.
28. Ballinger AB, Azooz O, El-Haj T, Poole S, Farthing MJ. Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis. *Gut.* 2000 May;46(5):694-700.
29. Wang P, Li N, Li JS, Li WQ. The role of endotoxin, TNF-alpha, and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. *World J Gastroenterol.* 2002 Jun;8(3):531-6.
30. Wang P, Li N, Li JS. Mechanism of growth hormone insensitivity induced by endotoxin. *Acta Pharmacol Sin.* 2002 Jan;23(1):16-22.
31. Fan J, Wojnar MM, Theodorakis M, Lang CH. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1. *Am J Physiol.* 1996 Mar;270(3 Pt 2):R621-9.
32. Wolf M, Bohm S, Brand M, Kreymann G. Proinflammatory cytokines interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. *Eur J Endocrinol.* 1996 Dec;135(6):729-37.
33. Samstein B, Hoimes ML, Fan J, Frost RA, Gelato MC, Lang CH. IL-6 stimulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Nov 12;228(2):611-5.
34. Thissen JP, Verniers J. Inhibition by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha of the insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid response to growth hormone in rat hepatocyte primary culture. *Endocrinology.* 1997 Mar;138(3):1078-84.
35. Boisclair YR, Wang J, Shi J, Hurst KR, Ooi GT. Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1beta on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells. *J Biol Chem.* 2000 Feb 11;275(6):3841-7.
36. Colson A, Le Cam A, Maiter D, Edery M, Thissen JP. Potentiation of growth hormone-induced liver suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid by cytokines. *Endocrinology.* 2000 Oct;141(10):3687-95.

37. Denson LA, Held MA, Menon RK, Frank SJ, Parlow AF, Arnold DL. Interleukin-6 inhibits hepatic growth hormone signaling via upregulation of Cis and Socs-3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Apr;284(4):G646-54.
38. Shumate ML, Yumet G, Ahmed TA, Cooney RN. Interleukin-1 inhibits the induction of insulin-like growth factor-I by growth hormone in CWSV-1 hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Aug;289(2):G227-39.
39. Ahmed T, Yumet G, Shumate M, Lang CH, Rotwein P, Cooney RN. Tumor necrosis factor inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jul;291(1):G35-44.
40. Ahmed TA, Buzzelli MD, Lang CH, Capen JB, Shumate ML, Navaratnarajah M, et al. Interleukin-6 inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jun;292(6):G1793-803.
41. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):495-522.
42. Maduzia D, Matuszyk A, Ceranowicz D, Warzecha Z, Ceranowicz P, Fyderek K, et al. The influence of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2015. Dec;66(6):875-85.
43. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1707-20.
44. Mao Y, Cheng J, Yu F, Li H, Guo C, Fan X. Ghrelin Attenuated Lipotoxicity via Autophagy Induction and Nuclear Factor-kappaB Inhibition. *Cell Physiol Biochem*. 2015. 37(2):563-76.
45. Li Y, Hai J, Li L, Chen X, Peng H, Cao M, et al. Administration of ghrelin improves inflammation, oxidative stress, and apoptosis during and after non-alcoholic fatty liver disease development. *Endocrine*. 2013. Apr;43(2):376-86.
46. Mao Y, Wang J, Yu F, Cheng J, Li H, Guo C, et al. Ghrelin reduces liver impairment in a model of concanavalin A-induced acute hepatitis in mice. *Drug Des Devel Ther*. 2015. 9:5385-96.
47. Cheyuo C, Wu R, Zhou M, Jacob A, Coppa G, Wang P. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. *Shock*. 2011. Mar;35(3):258-65.
48. Wu R, Dong W, Zhou M, Cui X, Hank Simms H, Wang P. Ghrelin improves tissue perfusion in severe sepsis via downregulation of endothelin-1. *Cardiovasc Res*. 2005 Nov 1;68(2):318-26.

49. Wu R, Dong W, Cui X, Zhou M, Simms HH, Ravikumar TS, et al. Ghrelin down-regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve. *Ann Surg*. 2007 Mar;245(3):480-6.
50. Wu R, Dong W, Zhou M, Zhang F, Marini CP, Ravikumar TS, et al. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Oct 15;176(8):805-13.
51. Wu R, Zhou M, Dong W, Ji Y, Miksa M, Marini CP, et al. Ghrelin hyporesponsiveness contributes to age-related hyperinflammation in septic shock. *Ann Surg*. 2009 Jul;250(1):126-33.
52. Wu R, Dong W, Qiang X, Wang H, Blau SA, Ravikumar TS, et al. Orexigenic hormone ghrelin ameliorates gut barrier dysfunction in sepsis in rats. *Crit Care Med*. 2009 Aug;37(8):2421-6.
53. Wei H, Cao X, Zeng Q, Zhang F, Xue Q, Luo Y, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and prevents cognitive impairment in septic rats. *Crit Care Med*. 2015. May;43(5):e143-50.
54. Khowailed A, Younan SM, Ashour H, Kamel AE, Sharawy N. Effects of ghrelin on sepsis-induced acute kidney injury: one step forward. 2015. *Clin Exp Nephrol*. Jun;19(3):419-26.
55. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4325-8.
56. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*. 2002 Apr;143(4):1353-61.
57. 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 Regul Integr Comp Physiol*. 2001 May;280(5):R1483-7.
58. Yilmaz Z, Ilcol YO, Ulus IH. Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. *Crit Care Med*. 2008 Mar;36(3):828-33.
59. Vila G, Maier C, Riedl M, Nowotny P, Ludvik B, Luger A, et al. Bacterial endotoxin induces biphasic changes in plasma ghrelin in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Oct;92(10):3930-4.

60. Vila G, Riedl M, Resl M, van der Lely AJ, Hofland LJ, Clodi M, et al. Systemic administration of oxytocin reduces basal and lipopolysaccharide-induced ghrelin levels in healthy men. *J Endocrinol*. 2009 Oct;203(1):175-9.
61. Basa NR, Wang L, Arteaga JR, Heber D, Livingston EH, Tache Y. Bacterial lipopolysaccharide shifts fasted plasma ghrelin to postprandial levels in rats. *Neurosci Lett*. 2003 May 29;343(1):25-8.
62. Wu R, Zhou M, Cui X, Simms HH, Wang P. Upregulation of cardiovascular ghrelin receptor occurs in the hyperdynamic phase of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Sep;287(3):H1296-302.
63. Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2011. Mar;23(1):41-66.
64. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 2006 Jan;86(1):9-22.
65. Eder J. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Sep;18(9):319-22.
66. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1634-5.
67. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis*. 2010. 28(6):737-44.
68. Bawa M, Saraswat VA. Gut-liver axis: role of inflammasomes. *J Clin Exp Hepatol*. 2013. Jun;3(2):141-9.
69. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*. 1990 Sep 11;192(2):245-61.
70. Wu R, Dong W, Ji Y, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, et al. Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. *PLoS One*. 2008;3(4):e2026.
71. Rajan D, Wu R, Shah KG, Jacob A, Coppa GF, Wang P. Human ghrelin protects animals from renal ischemia-reperfusion injury through the vagus nerve. *Surgery*. 2012. Jan;151(1):37-47.
72. Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, Iida M. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension*. 2004 May;43(5):977-82.

73. Li Y, Wu X, Zhao Y, Chen S, Owyang C. Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jun;290(6):G1350-8.
74. 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 Apr;148(4):1638-47.
75. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):458-62.
76. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*. 2003 May-Aug;9(5-8):125-34.
77. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007 Feb;117(2):289-96.
78. Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci*. 2014. May;182:65-9.
79. Wu R, Zhou M, Das P, Dong W, Ji Y, Yang D, et al. Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Dec;293(6):E1697-702.
80. Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Shibasaki T. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J Endocrinol*. 2009 Jun;201(3):341-9.
81. Mao Y, Tokudome T, Otani K, Kishimoto I, Miyazato M, Kangawa K. Excessive sympathoactivation and deteriorated heart function after myocardial infarction in male ghrelin knockout mice. *Endocrinology*. 2013. May;154(5):1854-63.
82. Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K, Abe I, Iida M. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension*. 2002 Nov;40(5):694-9.
83. Ferens DM, Yin L, Bron R, Hunne B, Ohashi-Doi K, Kitchener PD, et al. Functional and in situ hybridization evidence that preganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons express ghrelin receptors. *Neuroscience*. 2010. Mar 17;166(2):671-9.
84. 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. Oct 15;303(8):H1011-21.

85. Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Cragg PA, Shirai M, et al. One dose of ghrelin prevents the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone after myocardial infarction. *Endocrinology*. 2012. May;153(5):2436-43.
86. Szelenyi J, Kiss JP, Vizi ES. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice. *J Neuroimmunol*. 2000 Feb 1;103(1):34-40.
87. Miksa M, Wu R, Zhou M, Wang P. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine. *Front Biosci*. 2005;10:2217-29.
88. Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery*. 2008 Mar;143(3):334-42.
89. Li B, Zeng M, He W, Huang X, Luo L, Zhang H, et al. Ghrelin protects alveolar macrophages against lipopolysaccharide-induced apoptosis through growth hormone secretagogue receptor 1a-dependent c-Jun N-terminal kinase and Wnt/beta-catenin signaling and suppresses lung inflammation. *Endocrinology*. 2015. Jan;156(1):203-17.
90. Xu X, Jhun BS, Ha CH, Jin ZG. Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. *Endocrinology*. 2008 Aug;149(8):4183-92.
91. Sudar E, Dobutovic B, Soskic S, Mandusic V, Zakula Z, Misirkic M, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase activity/expression in rat hearts from ghrelin-treated rats. *J Physiol Biochem*. 2011. Jun;67(2):195-204.
92. Wang Y, Narsinh K, Zhao L, Sun D, Wang D, Zhang Z, et al. Effects and mechanisms of ghrelin on cardiac microvascular endothelial cells in rats. *Cell Biol Int*. 2011. Feb;35(2):135-40.
93. Rezaeian F, Wettstein R, Scheuer C, Baumker K, Bachle A, Vollmar B, et al. Ghrelin protects musculocutaneous tissue from ischemic necrosis by improving microvascular perfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010. Feb 1;302(3):H603-10.

94. Aoki H, Nakata M, Dezaki K, Lu M, Gantulga D, Yamamoto K, et al. Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. *Endocr J*. 2013;60(5):571-81.
95. Zeng M, He W, Li L, Li B, Luo L, Huang X, et al. Ghrelin attenuates sepsis-associated acute lung injury oxidative stress in rats. *Inflammation*. 2015. Apr;38(2):683-90.
96. Granado M, Martin AI, Lopez-Menduina M, Lopez-Calderon A, Villanua MA. GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Jan;294(1):E131-41.
97. Chang L, Zhao J, Yang J, Zhang Z, Du J, Tang C. Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. *Eur J Pharmacol*. 2003 Jul 25;473(2-3):171-6.
98. Chang L, Du JB, Gao LR, Pang YZ, Tang CS. Effect of ghrelin on septic shock in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2003 Jan;24(1):45-9.
99. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 28;275(2):477-80.
100. Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Vercellotti A, Petri A, Radetti G, et al. Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. *J Endocrinol Invest*. 2003 Apr;26(4):RC9-11.
101. Poykko SM, Ukkola O, Kauma H, Kellokoski E, Horkko S, Kesaniemi YA. The negative association between plasma ghrelin and IGF-I is modified by obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Feb;48(2):309-16.
102. Livingstone C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clin Sci (Lond)*. 2013. Sep;125(6):265-80.
103. Chanson P, Salenave S. Acromegaly. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:17.
104. Federico G, Street ME, Maghnie M, Caruso-Nicoletti M, Loche S, Bertelloni S, et al. Assessment of serum IGF-I concentrations in the diagnosis of isolated childhood-onset GH deficiency: a proposal of the Italian Society for Pediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP/ISPED). *J Endocrinol Invest*. 2006 Sep;29(8):732-7.
105. Peisen JN, McDonnell KJ, Mulroney SE, Lumpkin MD. Endotoxin-induced suppression of the somatotrophic axis is mediated by interleukin-1 beta and

corticotropin-releasing factor in the juvenile rat. *Endocrinology*. 1995

Aug;136(8):3378-90.

106. Priego T, Ibanez de Caceres I, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Endotoxin administration increases hypothalamic somatostatin mRNA through nitric oxide release. *Regul Pept*. 2005 Jan 15;124(1-3):113-8.

107. Zhao Y, Xiao X, Frank SJ, Lin HY, Xia Y. Distinct mechanisms of induction of hepatic growth hormone resistance by endogenous IL-6, TNF-alpha, and IL-1beta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014. Jul 15;307(2):E186-98.

108. Colson A, Willems B, Thissen JP. Inhibition of TNF-alpha production by pentoxifylline does not prevent endotoxin-induced decrease in serum IGF-I. *J Endocrinol*. 2003 Jul;178(1):101-9.

109. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

110. Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jan;41 Suppl A:31-9.

111. Hollenberg SM, Cinel I. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness--update 2008. *Crit Care*. 2009;13(4):218.

112. Szabo C, Modis K. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock*. 2010. Sep;34 Suppl 1:4-14.

113. Hunninghake GW, Doerschug KC, Nymon AB, Schmidt GA, Meyerholz DK, Ashare A. Insulin-like growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010. Aug 15;182(4):517-25.

114. Ashare A, Nymon AB, Doerschug KC, Morrison JM, Monick MM, Hunninghake GW. Insulin-like growth factor-1 improves survival in sepsis via enhanced hepatic bacterial clearance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jul 15;178(2):149-57.

115. Inoue T, Saito H, Fukushima R, Inaba T, Lin MT, Fukatsu K, et al. Growth hormone and insulinlike growth factor I enhance host defense in a murine sepsis model. *Arch Surg*. 1995 Oct;130(10):1115-22.

Figure 1. Effect of LPS administration (5mg / kg, ip) and / or ghrelin (15nmol / kg iv) on serum TNF- α concentration at 2h (A), 6h (B), 12h (C) and on liver concentrations of TNF- α in 2h (D), 6h (E) and 12h (F). Different letters represent significant differences. Number of animals per group: 6-10.

Figure 2. Effect of LPS administration (5mg / kg, ip) and / or ghrelin (15nmol / kg iv) on serum IL-1 β concentration at 2h (A), 6h (B), 12h (C) and on liver concentrations of TNF- α in 2h (D), 6h (E) and 12h (F). Different letters represent significant differences. Number of animals per group: 6-10.

Figure 3. Effect of LPS administration (5mg / kg, ip) and / or ghrelin (15nmol / kg iv) on serum IL-6 concentration at 2h (A), 6h (B), 12h (C) and on liver concentrations of TNF- α in 2h (D), 6h (E) and 12h (F). Different letters represent significant differences. Number of animals per group: 6-10.

Figure 4. Effect of LPS administration (5mg / kg, ip) and / or ghrelin (15nmol / kg iv) on plasma nitrate concentration at 2h (A), 6h (B), 12h (C). Different letters represent significant differences. Number of animals per group: 7-10.

Figure 5. Effect of LPS administration (5mg / kg, ip) and / or ghrelin (15nmol / kg iv) on plasma ghrelin concentration at 2h (A), 6h (B) and 12h (C); on serum concentration of IGF-1 at 2h (D), 6h (E) and 12h (F); on serum GH concentration at 2h (G), 6h (H) and 12h (I). Different letters represent significant differences. Number of animals per group: 6-10.

Figure 6. Effect of LPS administration (5mg / kg, ip) and / or ghrelin (15nmol / kg iv) on animals survival. In parenthesis, number of animals per group.