

Expressão de grelina no olho e a sua implicação na redução da pressão intraocular

Rodrigues-Araújo J.³, Pereira-Silva P.², Azevedo-Pinto S.², Tavares-Silva M.², Pinho S.², Rocha-Sousa A.^{1,3}

¹Departamento dos órgãos dos sentidos; Faculdade de Medicina Universidade do Porto.

²Departamento de Fisiologia e Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

³Serviço de oftalmologia Hospital S. João.

RESUMO

Objectivo: Avaliar a distribuição da grelina e do seu receptor (GHSR-1) no globo ocular de rato adulto e avaliar o papel da grelina na modulação da pressão intra-ocular (PIO) em modelos animais de glaucoma agudo.

Métodos: Foi realizada imunolocalização da grelina e seu receptor (GHSR-1) em ratos machos adultos Wistar (300-480g). Foi induzido glaucoma agudo em coelhos brancos Neozelandeses (2.0 – 3.0 Kg) e ratos machos adultos Wistar (300-480g) através de injeção intravítrea de 20% de NaCl. Posteriormente realizou-se uma injeção subconjuntival de grelina (em coelho: 10^{-4} M; n=6; em rato: 10^{-4} M; n=13) ou des-acil-grelina (em coelho: 10^{-4} M; n=6; em rato: 10^{-4} M; n=18) e foram registados os valores de PIO. No coelho foram também estudadas as vias sub-celulares envolvidas, nomeadamente avaliando o efeito da grelina na PIO após injeção subconjuntival de ceterolac (inibidor da COX, 30 mg/ml; 500 μ L; n=5) e L-NAME (inibidor da síntese do NO; 150mg/Kg; 500 μ L; n=9).

Resultados: Foi identificada a presença de grelina nos processos ciliares e a presença do seu receptor (GHSR-1) no estroma do corpo ciliar e na coróide. Em relação ao efeito na PIO, verificou-se que a grelina diminui a PIO em dois modelos animais (coelho e rato) de glaucoma agudo (percentagem máxima diminuição em relação ao controlo em coelho $43.82 \pm 10.81\%$; percentagem máxima diminuição em relação ao controlo em rato $34.42 \pm 11.62\%$). Dos resultados obtidos verificou-se que a des-acil grelina não altera significativamente a PIO em coelho, mas leva a uma diminuição da mesma no modelo de rato (diferença máxima face ao controlo de $45.84 \pm 10.77\%$). No coelho o efeito da grelina foi abolido com a adição de ceterolac e L-NAME.

Conclusão: A grelina e seu receptor (GHSR-1) são expressos no tecido ocular de rato. A grelina promove diminuição da PIO em olhos de rato e coelho após indução de glaucoma agudo. Os presentes resultados sugerem a existência de um papel para a grelina na patofisiologia do glaucoma.

Palavras chave

Grelina; des-acil-grelina; glaucoma agudo; hipertensão ocular.

ABSTRACT

Purpose: To investigate ghrelin's and GHSR-1 distribution in the rat's ocular tissue and ghrelin's role in the modulation of IOP in animal models of acute glaucoma. **Methods:** Immunolocalization of ghrelin and GHSR-1 was performed in male Wistar rats (250–500g). Acute glaucoma was induced in male New Zealand white rabbits (2,0-3,0Kg) and male Wistar rats (200–300g) through an intravitreal injection of 20% NaCl. Afterwards either ghrelin or des-acyl ghrelin was

subconjunctivaly injected. In the rabbit, ghrelin's effect in the presence of L-NAME or ketorolac. **Results:** Ghrelin and GHSR-1 were detected in the rat's eye, being ghrelin expressed in the ciliary processes, having localization in the vicinity of lectin, an endothelial cell marker, been also verified. GHSR-1 expression was detected in the base of the ciliary body and in the choroid. Ghrelin, but not des-acyl ghrelin, decreased the IOP in rabbit's and rat's glaucomatous eyes (maximal percentual decrease relative to peak versus control in rabbit: 43.82 ± 10.81 %; maximal percentual decrease relative to peak versus control in rat: 34.42 ± 11.62 %). In the rabbit, this effect was blunted in the presence of L-NAME and ketorolac.

Conclusions: Ghrelin and GHSR-1 are expressed in the rat's eye. Ghrelin promoted a decrease in the IOP of rat's and rabbit's glaucomatous eyes. These data suggest a role for ghrelin in the pathophysiology of glaucoma.

Key-words

Ghrelin; des-acyl-ghrelin; acute glaucoma; ocular hypertension.

INTRODUÇÃO

A grelina e a des-acil-grelina são dois peptídeos derivados do mesmo gene¹. A grelina é um peptídeo acilado com 28 aminoácidos. Foi isolada pela primeira vez em 1999 a partir da mucosa de fundo gástrico de rato e actua como ligando endógeno do receptor tipo 1a dos secretagogos da hormona do crescimento (GHSR-1a)². A des-acil grelina é semelhante à grelina, mas não possui o grupo octanoil na serina localizada na posição 3, não tendo por isso capacidade de ligação ao receptor GHSR-1a³. A forma desacilada da grelina representa cerca de 90% do peptídeo circulante e, apesar de inicialmente não lhe ter sido atribuída nenhuma função biológica, recentemente têm sido descritos efeitos provocado pela des-acil-grelina⁴⁻⁶.

A primeira acção atribuída à grelina foi a promoção da libertação da hormona de crescimento através da estimulação do receptor GHSR-1a. No entanto a grelina é também expressa e actua em vários órgãos^{2,4-8}, entre os quais o olho⁹.

O GHSR-1a, tal como a grelina, é também amplamente expresso no organismo, no entanto nem sempre há sobreposição na distribuição da grelina e seu receptor⁸. O receptor tem expressão marcada na hipófise e núcleo arqueado hipotalâmico¹⁰, estando também presente em outras áreas do SNC e em tecidos periféricos^{8,11-13}. Uma vez que as isoformas não aciladas, embora não se ligando ao GHSR-1a, também apresentam actividade biológica, acredita-se na existência de outros receptores diferentes deste responsáveis por essas acções^{4,5,8}. A título de exemplo, tanto a grelina como a sua isoforma desacilada são responsáveis pelo efeito inotrópico negativo e pelo relaxamento do músculo esfíncter da íris, efeitos estes não dependentes do GHSR-1a^{5,9}. No músculo esfíncter da íris, o efeito relaxante da

grelina é ainda dependente da síntese de prostaglandinas⁹. A grelina exerce também um efeito relaxante no músculo dilatador da íris, sendo neste caso o efeito mediado pelo GHSR-1a⁹.

O ARNm da grelina foi identificado no epitélio posterior da íris e no epitélio não-pigmentado do corpo ciliar, o que poderá indicar um sistema de regulação parácrina importante na função destes músculos⁹.

Recentemente foi descrita uma diminuição dos níveis de grelina no humor aquoso de doentes com glaucoma crónico de ângulo aberto^{14,15} e em doentes com glaucoma pseudoesfoliativo¹⁵, não sendo esta acompanhada de diminuição dos níveis plasmáticos de grelina, o que poderá contribuir também para a formulação da hipótese de um sistema regulador ocular local.

Tendo em conta o exposto, com o presente estudo pretende-se avaliar a distribuição da grelina e do seu receptor (GHSR-1a) em tecido ocular de rato adulto e avaliar o papel da grelina na modulação da PIO em modelos animais de glaucoma agudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos decorreram de acordo com a declaração da ARVO para o uso de animais na investigação oftalmológica e da visão. Os estudos foram realizados em coelhos machos albinos Neozelandeses (2,0-3,0 kg) e em ratos machos adultos Wistar (250-400g). Os animais foram mantidos em caixas com temperatura e humidade controladas, com livre acesso a comida e água e sob um ciclo de luz-escuridão de 12h.

Imunolocalização da grelina e do GHSR-1 por imunofluorescência

Ratos Wistar adultos foram eutanasiados através de uma injeção intraperitoneal de uma dose letal de pentobarbital de sódio. As amostras foram recolhidas, lavadas em tampão fosfato salino (PBS) e fixadas em paraformaldeído (PFA) a 4% durante 6 horas. Após a fixação, as amostras foram crioprotégidas em concentrações crescentes de sacarose: 10% durante 30 minutos, 20% durante 2 horas e finalmente 30% a 4°C durante a noite. Posteriormente os olhos foram envolvidos em OCT e guardados a -80°C até à sua utilização. Obtiveram-se crio-seções com 10 µm de espessura, as quais foram colocadas em lâminas Superfrost Plus®. Para realização do protocolo de imunofluorescência, as lâminas foram hidratadas em PBS, permeabilizadas em PBST e bloqueadas com albumina plasmática de bovino (BSA) a 3%, sendo depois incubadas com anti-corpos primários anti-grelina (1:250), anti-GHSR-1 (1:250) ou com BSA a 1% (controlo negativo) a 4°C durante 24 horas. Posteriormente procedeu-se à lavagem com PBST e à incubação com um anti-corpo secundário (1:1000) acoplado a um fluorocromo, durante 1 hora. Finalmente, todas as lâminas previamente marcadas com anti-corpo primário anti-grelina foram incubadas com lectina marcada com TRITC (Tetrametil Isotiocianato de Rodamina) (1:50), durante 1 hora. Após as incubações, todas as lâminas foram montadas em PBS/Glicerol contendo DAPI (1:10000) e visualizadas sob microscópio de fluorescência.

Calibração do Tonómetro

A calibração do tonómetro de impacto TonoVet® (Icare, Helsinki, Finlândia) foi conseguida através da comparação entre as medições obtidas com este e as de uma manometria da câmara anterior realizada in vivo. Para tal, coelhos machos albinos neozelandeses (2,0-3,0 kg) e ratos machos adultos wistar (300-480g) foram anestesiados através da injeção intramuscular (no coelho) ou intraperitoneal (no rato) de uma mistura contendo cloridrato de cetamina (Imalgene 1000®, Merial; 40 mg/Kg no coelho, 75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer; 8 mg/Kg no coelho, 5 mg/Kg no rato), tendo também sido aplicada oxibuprocaina 0,4% (Anestocil, Edol, Portugal) tópica para anestesia corneana. Após confirmação da profundidade adequada da anestesia através da reacção à dor, procedeu-se à canulação da câmara anterior pela introdução de uma agulha de calibre 25 G ligeiramente anterior ao limbo. A agulha encontrava-se ligada a um sistema composto por um reservatório de soro (NaCl 0,9%) e a um transdutor de pressão conectado a um monitor (Datascop 2000 A) utilizados para a medição da pressão intra-ocular real (figura

1). A pressão intra-ocular real foi alterada promovendo-se a subida ou descida do reservatório de soro. Variou-se esta pressão entre 5 a 60 mmHg no coelho e 5 a 80 mmHg no rato. A relação da pressão real e da pressão medida pelo tonómetro TonoVet®, foi registada em intervalos de 5 mmHg (5 medições seguidas para cada nível de pressão).

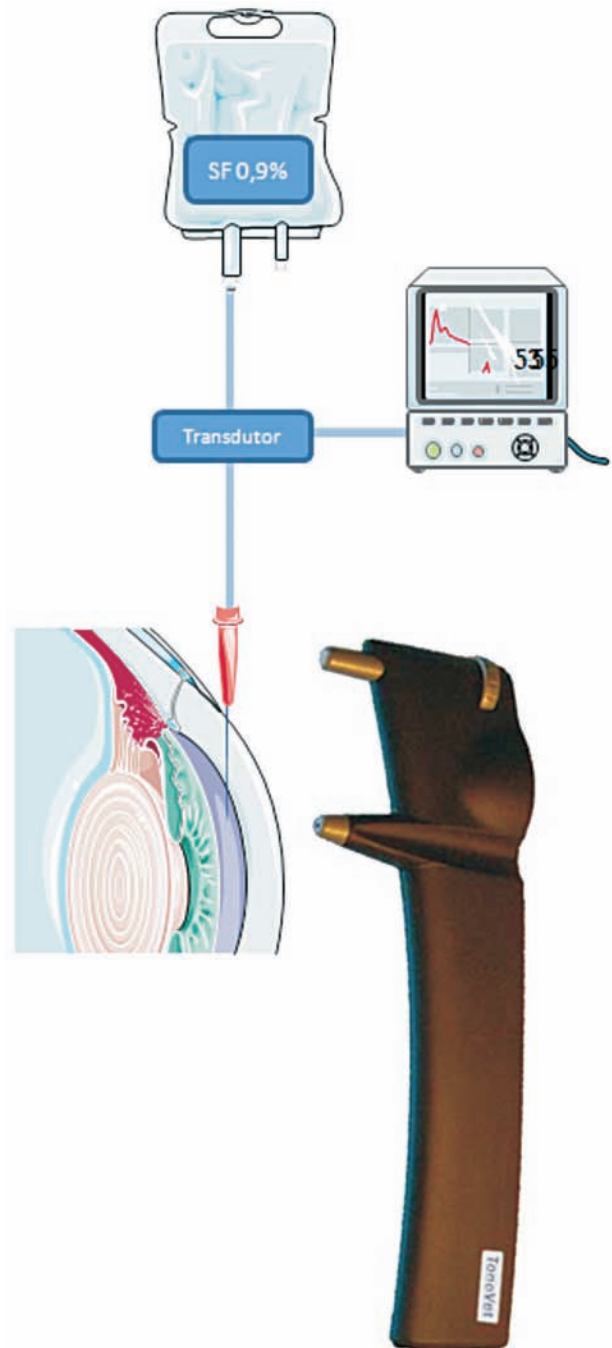


Fig. 1 | Calibração do tonómetro.

Modelo de glaucoma agudo e efeitos da grelina e da des-acil grelina na PIO

Inicialmente, o modelo de glaucoma foi implementado em coelho. Para tal, coelhos machos albinos Neozelandeses (2,0-3,0 kg) foram anestesiados através da injeção intra-muscular de uma mistura contendo cloridrato de cetamina (Imalgene 1000®, Merial; 40 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer; 8 mg/Kg), tendo também sido aplicada oxibuprocaina 0,4% (Anestocil®, Edol, Portugal) tópica para anestesia corneana. Uma vez assegurada a anestesia, procedeu-se à medição da PIO basal. A subida da pressão intra-ocular foi conseguida pela injeção intravítrea uma solução salina hipertónica (NaCl 20%, 50 µL) em ambos os olhos. Nove minutos após a injeção intravítrea, procedeu-se à injeção sub-conjuntival (50 µL) de grelina (10⁻⁴ M, n=6) ou des-acil grelina (10⁻⁴ M, n=6), em apenas um dos olhos, selecionado aleatoriamente. O grupo controlo (n=7) recebeu a injeção intravítrea de solução salina hipertónica e após 9 minutos uma injeção sub-conjuntival de solução salina veículo (50 µL). A média de 5 medições obtidas com o TonoVet® foi registada a cada 15 minutos durante um período de 5 horas.

Para estudar a influência do óxido nítrico e das prostaglandinas no efeito da grelina, procedeu-se à injeção subconjuntival de um inibidor da síntese do óxido nítrico (L-NAME; 500 µL; 150 mg/Kg; n=9) ou de um inibidor não selectivo das ciclooxigenases (Ceterolac; 500 µL; solução de 30 mg/mL; n=5) 30 minutos antes da indução do glaucoma.

Para a implementação do modelo de glaucoma agudo no rato, animais adultos machos Wistar (300-480 g) foram anestesiados através da injeção intraperitoneal de uma mistura contendo cloridrato de cetamina (Imalgene 1000®, Merial; 75 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer; 5 mg/Kg), tendo também sido aplicada oxibuprocaina 0,4% (Anestocil, Edol, Portugal) tópica para anestesia corneana. Uma vez assegurada a anestesia, procedeu-se à medição da PIO basal. Para aumentar a PIO injectou-se intravítreamente uma solução salina hipertónica (NaCl 20%, 16 µL) em ambos os olhos. Nove minutos após a injeção intravítrea, procedeu-se à injeção sub-conjuntival (15 µL) de grelina (10⁻⁴ M, n=13) ou des-acil grelina (10⁻⁴ M, n=18), em apenas um dos olhos, selecionado aleatoriamente. O grupo controlo recebeu a injeção intravítrea de solução salina hipertónica e após 9 minutos uma injeção sub-conjuntival de solução salina veículo. Procedeu-se então à medição da PIO com o TonoVet® aos 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a injeção intravítrea e posteriormente a cada 15 minutos, até um total de 2 horas.

Análise estatística

A correlação entre os valores de PIO medidos com tonómetro e os valores efectivos de PIO obtidos por manometria realizada in vivo foi estabelecida através de um modelo de regressão linear. A comparação entre o grupo controlo e os grupos grelina ou des-acil grelina foi feita usando um teste t-student independente, ou teste correspondente não paramétrico. A comparação entre os grupos grelina e des-acil grelina foi feita usando o teste one-Way ANOVA. Valores de P inferiores a 0.05 (P<0.05) foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Imunolocalização da grelina e do GHSR-1 no globo ocular

A presença de grelina e do seu receptor foi identificada através de imunofluorescência, no segmento anterior dos globos oculares. A grelina encontra-se expressa predominantemente no estroma dos processos ciliares, rodeando internamente as células do epitélio ciliar (fig. 2a-c). Esta

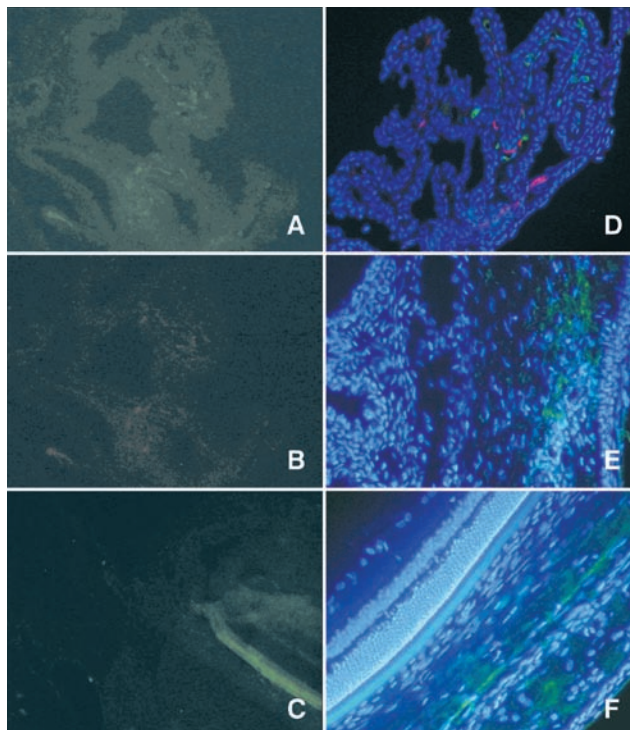


Fig. 2 | Imunofluorescência da grelina e GHSR-1 no segmento anterior. (A-C) Controlos negativos. (D)Co-localização da grelina e lectina no corpo ciliar.(E-F) Sinal positivo para GHSR-1 no corpo ciliar e na coróide respectivamente.

expressão é vizinha de células que expressam marcação pela lectina. Por seu turno o receptor GHSR 1 foi também detectado no globo ocular e apresenta uma expressão marcada na base do corpo ciliar e na coroideia (fig. 2d-f).

Calibração do tonómetro

Existe uma correlação entre os valores de PIO obtidos com o tonómetro TonoVet® e os valores obtidos por manometria directa (fig. 3a e 3b). O coeficiente de determinação foi de R²=0.87 no coelho (fig. 3a), e de R²=0.97 no rato (fig. 3b). Verifica-se que as leituras de PIO feitas pelo tonómetro são constantemente inferiores aos valores obtidos por

No rato:

$$PIO_{manométrica} = \frac{PIO_{Tonómetro} - 2.9473}{0,4594}$$

Modelo glaucoma agudo

Os valores de PIO apresentados representam a média ± EP. A PIO basal foi semelhante em todos os grupos.

No coelho, a solução salina hipertónica injectada no segmento posterior induziu um aumento consistente da PIO após os primeiros 15 minutos, de 34.82±4.1mmHg no grupo controlo, de 34.98±2.7mmHg no grupo da grelina e de 36.1±3.11mmHg no grupo da des-acil grelina. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o pico de pressão atingido pelos diferentes grupos. No grupo controlo verificou-se um aumento sustentado da PIO durante 2 horas e 30 minutos, com posterior diminuição e retorno aos valores basais às 5 horas.

No rato a injeção da solução salina hipertónica no segmento posterior também induziu um aumento marcado da PIO logo aos 5 minutos. Este aumento foi de 59.28±4.26 mmHg no grupo controlo, de 49.63±4.31mmHg no grupo da grelina e de 49.70±3.61 mmHg no grupo da des-acil grelina, não se evidenciando diferenças estatisticamente significativas nos valores máximos de PIO entre os grupos. No grupo controlo verificou-se um aumento sustentado da PIO durante 20 minutos, altura a partir da qual a pressão diminuiu atingindo os valores basais às 2 horas.

Efeitos dos peptídeos derivados da Progrelina na PIO

No coelho, a grelina induziu uma diminuição na PIO que se tornou evidente desde os 90 até aos 165 minutos (fig. 4a). A diminuição máxima da PIO observou-se ao minuto 165, correspondendo a uma diminuição de 43.82±10.81% relativamente ao controlo (fig. 4a). A des-acil grelina não provocou diminuição estatisticamente significativa na PIO

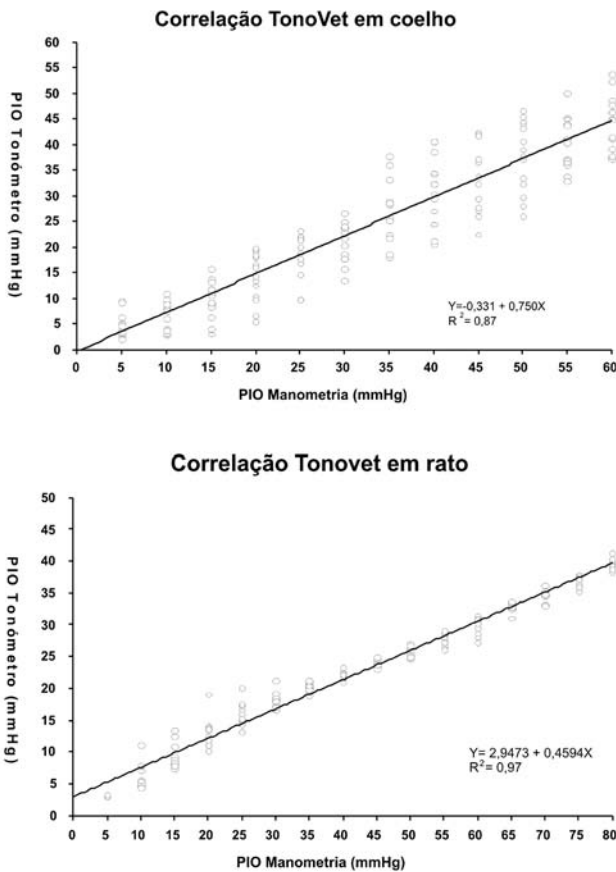


Fig. 3 (A-B) | Correlação entre as medidas de PIO obtidas por manometria e tonometria no coelho e n rato.

manometria. Todas as medidas de PIO obtidas pelo tonómetro foram ajustadas usando as seguintes equações:

No coelho:

$$PIO_{manométrica} = \frac{PIO_{Tonómetro} + 0.331}{0.75}$$

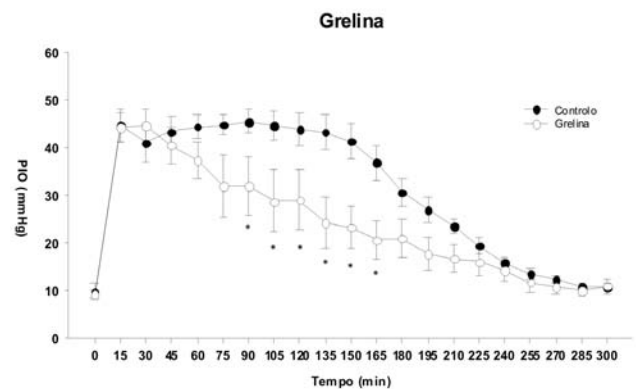


Fig. 4 (A) | Efeito da grelina na PIO de olhos glaucomatosos de coelho. *p<0.05 vs controlo.

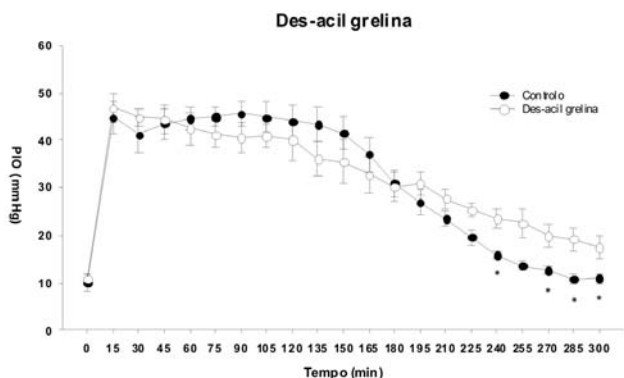


Fig. 4 (B) | Efeito da des-acyl-grelina na PIO de olhos glaucomatosos de coelho. * $p < 0.05$ vs controlo.

(fig. 4b). No final do protocolo, enquanto no grupo controlo os valores de PIO tenderam para os valores iniciais, nos olhos injectados com des-acyl grelina o valor PIO manteve-se maior do que no grupo controlo (17.42 ± 2.38 mmHg versus 10.92 ± 0.94 mmHg ao minuto 300). Quando se procedeu à inibição das vias do óxido nítrico (fig. 5a) e da produção

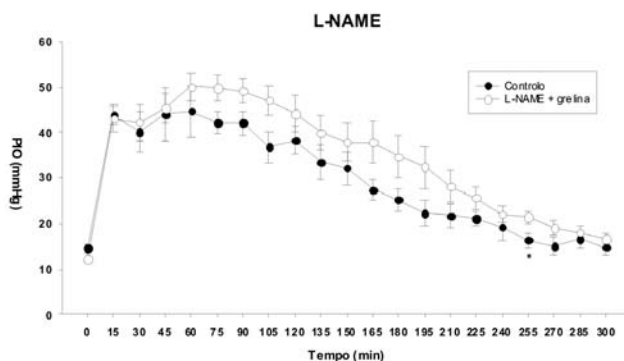


Fig. 5 (A) | Influência do L-NAME no efeito da grelina na PIO de olhos glaucomatosos de coelho. * $p < 0.05$ vs controlo.

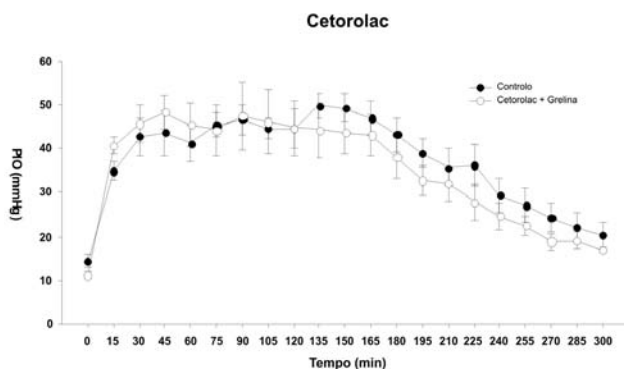


Fig. 5 (B) | Influência do ceterolac no efeito da grelina na PIO de olhos glaucomatosos de coelho. * $p < 0.05$ vs controlo.

das prostaglandinas (fig. 5b), o efeito hipotensor da grelina foi completamente anulado. No rato, a grelina promoveu a diminuição da PIO, a qual se verificou estatisticamente significativa face ao controlo desde os 10 até aos 30 minutos (fig. 6a). A diminuição máxima da PIO observou-se ao minuto 30, correspondendo a uma diminuição de $34.42 \pm 11.62\%$ relativamente ao controlo (fig. 6a). A des-acyl grelina provocou uma descida estatisticamente significativa da PIO entre os minutos 10 e 75, com uma percentagem máxima de queda face ao controlo de $45.84 \pm 10.77\%$ ao minuto 45 (fig. 6b).

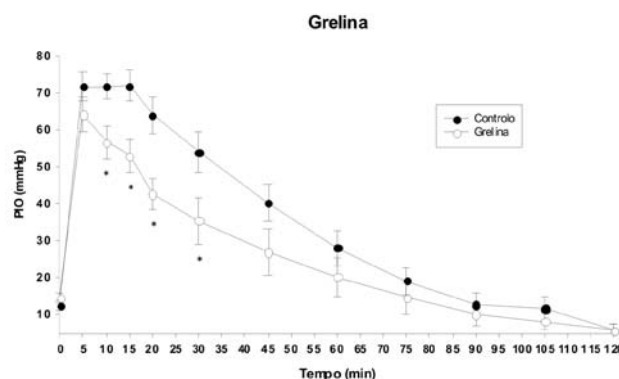


Fig. 6 (A) | Efeito da grelina na PIO de olhos glaucomatosos de rato. * $p < 0.05$ vs olhos controlo.

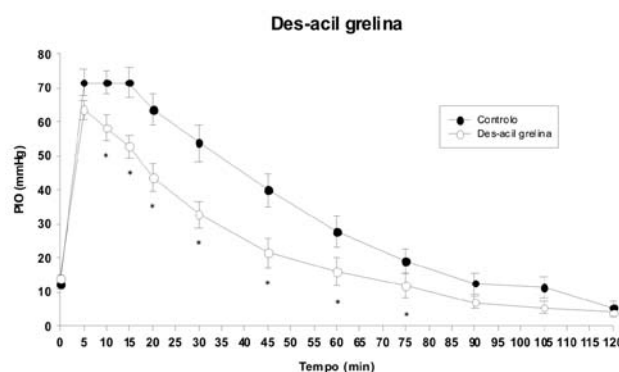


Fig. 6 (B) | Efeito da des-acyl-grelina na PIO de olhos glaucomatosos de rato. * $p < 0.05$ vs olhos controlo.

DISCUSSÃO

O RNAm da grelina foi identificado anteriormente no epitélio posterior da íris e nas células do corpo ciliar⁹. Esta identificação associada à sua identificação no humor aquoso¹⁴ levantou a hipótese da existência de um sistema de produção e regulação local relativo a este peptídeo. No nosso estudo localizamos por imunofluorescência a

presença de grelina no globo ocular do rato. Esta está presente no estroma dos processos ciliares rodeando, por dentro as células do epitélio ciliar. A este achado junta-se a sua vizinhança com células endoteliais vasculares. Por seu turno o receptor GHSR-1 está expresso no segmento anterior, prioritariamente na zona basal de transição entre o corpo ciliar e a esclera. Assim conseguimos acrescentar alguns dados que permitem inferir a presença de um sistema de produção e acção local da grelina, no corpo ciliar.

A medição da PIO usando tonómetro de impacto subestima os valores de PIO no coelho e no rato, à semelhança do que ocorre com outros tonómetros¹⁶, pelo que foi feita a calibração do tonómetro tal como descrito de forma a obter os valores reais de PIO. Esta calibração permite o uso do Tonovet® em experimentação animal em espécies diferentes daquelas para o qual ele estava calibrado.

O modelo animal de glaucoma agudo no coelho através da injeção de solução salina hipertónica (NaCl a 20%) no segmento posterior, permitiu um aumento agudo (valor máximo aos 15 minutos após injeção) e sustentado (até ao minuto 165) da PIO com valores equivalentes no grupo controlo. A consistência dos resultados obtidos com este modelo agudo de glaucoma comprova a sua estabilidade e reprodutibilidade. Este modelo mantém uma hipertensão ocular mais sustentada daquela descrita anteriormente por Orihashi¹⁷.

O envolvimento da grelina na patofisiologia do glaucoma já foi proposto pelo nosso grupo devido à observação de que os doentes glaucomatosos têm níveis diminuídos de grelina no humor aquoso^{14, 15}. Esses resultados sugerem que: (i) a diminuição da grelina pode estar etiológicamente envolvida em algumas formas de glaucoma; (ii) a diminuição dos níveis deste peptídeo no glaucoma pode ocorrer devido a alterações na sua produção provocada por um aumento da PIO; (iii) os níveis de grelina estão diluídos num maior volume do glaucoma. Os nossos resultados demonstram o efeito hipotensor da grelina em olhos com hipertensão ocular. Nos nossos modelos o efeito da grelina é muito marcado, atingido uma diminuição de 18.98 ± 5.22 mmHg na PIO, o que corresponde a uma diminuição percentual de $43.82 \pm 10.81\%$ relativamente ao controlo, no caso de coelho, e de 18.57 ± 6.27 mmHg ($34.43 \pm 11.63\%$) em rato. Foi também previamente demonstrado pelo nosso grupo que em doentes com glaucoma os níveis de des-acil grelina¹⁴ não estava alterado. Nestes modelos de glaucoma agudo a des-acil grelina não promoveu a diminuição da PIO no coelho, apesar de a ter promovido no rato. Os resultados de ambos os estudos indicam papéis diferentes para a des-acil grelina conforme a espécie. Este efeito pode ser devido ao papel do fluxo uveoescleral que é muito importante para a drenagem do humor aquoso no rato e pouco importante para o do coelho¹⁸.

Passando para as vias sub-celulares envolvidas em todo este processo, as prostaglandinas foram já implicadas como mediadoras da acção da grelina, como acontece no relaxamento do músculo esfíncter da íris mediada por este peptídeo⁹. A injeção sub-conjuntival de ceterolac, tal como foi realizada no protocolo supra-mencionado, leva ao estabelecimento de uma elevada concentração do mesmo no humor aquoso durante algumas horas¹⁹. Visto que inibindo a síntese de prostaglandinas o efeito hipotensor da grelina foi completamente abolido, podemos concluir que esta é uma das vias envolvidas no processo. Estes resultados aumentam a importância das prostaglandinas na regulação da tensão ocular e complementam o seu efeito hipotensor já previamente descrito. Sendo o seu uso clínico uma das melhores armas terapêuticas para o controlo crónico da tensão ocular a grelina poderá ter um efeito importante na potenciação do seu efeito. Outro dos mecanismos sub-celulares estudados foi a via do óxido nítrico, uma vez que já tinha sido previamente descrito que este leva a uma diminuição da PIO e a um aumento do fluxo sanguíneo ocular em coelhos²⁰. Tal como se verificou com a inibição da ciclooxigenase, também bloqueando a síntese do óxido nítrico através da adição de L-NAME se anulou completamente o efeito da grelina na modulação da PIO. Previamente foi também descrito o efeito hipotensor dos doadores de NO²⁰. Estes promovem a redução da tensão ocular de forma aguda. No entanto e ao contrário do que acontece em relação às prostaglandinas, não são usados como arma terapêutica. Assim a grelina pode descer mais significativamente a tensão ocular por estimular duas vias hipotensoras conhecidas e complementares.

A presença de grelina no interior dos processos ciliares bem como a sua acção no seu receptor GHSR, presente na base do corpo ciliar acrescenta importância ao efeito hipotensor observado. Podemos assim estar na presença de um novo sistema regulador da tensão ocular.

O possível envolvimento da grelina na patofisiologia do glaucoma, bem como o seu potencial uso como agente terapêutico, quer isoladamente, quer em combinação com outros fármacos, está a tornar-se cada vez mais sustentável.

BIBLIOGRAFIA

1. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln(14)-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:21995-22000.
2. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M,

- Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-660.
3. Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, et al. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2000;43:4370-4376.
 4. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *Journal of Cell Biology* 2002;159:1029-1037.
 5. Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, et al. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln (14)-ghrelin. *European Journal of Pharmacology* 2003;476:87-95.
 6. Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, et al. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 2004;150:173-184.
 7. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:909-913.
 8. Gnanapavan S, Kola B BS, Morris DG, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;86:2988-2991.
 9. Rocha-Sousa A, Saraiva J, Henriques-Coelho T, Falcão-Reis F, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF. Ghrelin as a novel locally produced relaxing peptide of the iris sphincter and dilator muscles. *Exp Eye Res* 2006;83:1179-1187.
 10. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;273:974-977.
 11. Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R. Ghrelin tissue distribution: Comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest* 2006;29:115-121.
 12. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP. I-125-His(9)-Ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2001;134:143-149.
 13. Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M, et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 2004;62:481-488.
 14. Rocha-Sousa A, Alves-Faria P, Falcão-Pires I, Falcão-Reis F, Leite-Moreira AF. Analyses of aqueous humour ghrelin levels of eyes with and without glaucoma. *Br J Ophthalmology* 2009;93:131-132.
 15. Katsanos A, Dastiridou A, Georgoulas P, Cholevas P, Kotoula M, Tsironi EE. Plasma and aqueous humour levels of ghrelin in open-angle glaucoma patients. *Clin Experiment Ophthalmol* 2011;39:324-329.
 16. Lim KS, Wickremasinghe SS, Cordeiro MF, Bunce C, Khaw PT. Accuracy of intraocular pressure measurements in new zealand white rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2419-2423.
 17. Orihashi M, Shima Y, Tsuneki H, Kimura I. Potent reduction of intraocular pressure by nipradilol plus latanoprost in ocular hypertensive rabbits. *Biol Pharm Bull* 2005;28:65-68.
 18. Alm A, Nilsson SF. Uveoscleral outflow--a review. *Exp Eye Res* 2009;88:760-768.
 19. Rabiah PK, Fiscella RG, Tessler HH. Intraocular penetration of periocular ketorolac and efficacy in experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:613-618.
 20. Chiou GC, Liu SX, Li BH, Chiang CH, Varma RS. Ocular hypotensive effects of L-arginine and its derivatives and their actions on ocular blood flow. *J Ocul Pharmacol Ther* 1995;11:1-10.