



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATASHA GUIMARÃES LUDWIG

**INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO, DO GÊNERO E DO
POLIMORFISMO RS18000437 DO RECEPTOR DO GIP
SOBRE A VARIAÇÃO DA ALDOSTERONEMIA EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Londrina
2016

NATASHA GUIMARÃES LUDWIG

**INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO, DO GÊNERO E DO
POLIMORFISMO RS18000437 DO RECEPTOR DO GIP
SOBRE A VARIAÇÃO DA ALDOSTERONEMIA EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Longo Mazzuco

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marla Karine
Amarante

Londrina
2016

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

Ludwig, Natasha Guimarães.

Influência da alimentação, do gênero e do polimorfismo rs18000437 do receptor do GIP sobre a variação da aldosteronemia em indivíduos saudáveis / Natasha Guimarães Ludwig. - Londrina, 2016.
51 f. : il.

Orientador: Tânia Longo Mazzuco.

Coorientador: Marla Karine Amarante.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Aldosterona - Tese. 2. GIPR - Tese. 3. alimentação - Tese. 4. gênero - Tese. I. Mazzuco, Tânia Longo. II. Amarante, Marla Karine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

NATASHA GUIMARÃES LUDWIG

**INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO, DO GÊNERO E DO
POLIMORFISMO RS18000437 DO RECEPTOR DO GIP SOBRE A
VARIAÇÃO DA ALDOSTERONEMIA EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Longo
Mazzuco Universidade Estadual de Londrina
- UEL

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de dezembro de 2016.

LUDWIG, Natasha Guimarães. **Influência da alimentação, do gênero e do polimorfismo rs18000437 do receptor do GIP sobre a variação da aldosteronemia em indivíduos saudáveis**. 2016. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Introdução: A secreção de aldosterona é principalmente regulada pelo sistema renina-angiotensina (SRA), níveis de potássio e pelo eixo hipotálamo-hipófise. Estudos anteriores associaram a hiperexpressão adrenocortical de GIPR com aumento de aldosterona pós-prandial relacionado a tumores adrenocorticais benignos. Em indivíduos saudáveis, a fisiologia da aldosterona basal relacionada com a função do receptor do GIP (GIPR) e os mecanismos que regulam a produção de aldosterona após a refeição são amplamente desconhecidos. **Objetivo:** Estudar os níveis plasmáticos de aldosterona, tanto de jejum quanto após alimentação, em indivíduos saudáveis e pesquisar associações entre o polimorfismo rs1800437 do gene do GIPR e o gênero com a secreção adrenocortical de mineralocorticóides. **Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de 33 indivíduos saudáveis e normotensos, antes (T0) e a cada 30 minutos (T30, T60, T90, T120 e T150) após a ingestão de uma refeição sob supressão do eixo hipotálamo hipófise-adrenal, pela dexametasona. A pressão arterial, a frequência cardíaca, as concentrações plasmáticas de aldosterona total, renina e cortisol foram medidas em todos os tempos. O DNA genômico foi isolado para genotipagem do polimorfismo rs1800437 do GIPR por ensaio de PCR-RFLP. **Resultados:** Observamos que os níveis de aldosterona plasmática em jejum nas mulheres são mais elevados do que nos homens. Após alimentação, houve aumento da aldosterona plasmática em 11 indivíduos (35%), sendo independente dos reguladores sistema renina-angiotensina em 5 deles (genótipos: 2 = GG, 2 = GC e 1 = CC). As concentrações sanguíneas de aldosterona no grupo de mulheres que não tiveram o alelo C polimórfico foram superiores às demais, tanto no jejum (ANOVA, $p = 0,008$) como após alimentação (ANOVA, $p = 0,008$). A maioria dos indivíduos apresentou picos de aldosterona em T90 e o maior incremento ocorreu em T150 (aumento de 31,5% para 270% e 311% em relação ao basal, respectivamente). **Conclusão:** Aumentos da aldosterona pós-prandial ocorreram em quase metade dos indivíduos, mostrando que esta não é uma resposta adrenal rara. Foi encontrada associação entre mulheres e a ausência do alelo C polimórfico com maiores concentrações sanguíneas de aldosterona, tanto em jejum quanto pós alimentação. Portanto, sugerimos que o GIP pode ser considerado um modulador da concentração sanguínea de aldosterona e que diferentes valores de referência entre mulheres e homens devem ser considerados na avaliação clínica do hiperaldosteronismo.

Palavras-chave: Córtex adrenal. Aldosterona. Gênero. GIPR. Polimorfismo. Pós-prandial. Eixo renina-angiotensina-aldosterona

LUDWIG, Natasha Guimarães. **Influência da alimentação, do gênero e do polimorfismo rs18000437 do receptor do GIP sobre a variação da aldosteronemia em indivíduos saudáveis**. 2016. 55p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Background: Aldosterone secretion is mainly regulated by the renin-angiotensin system (RAS), potassium levels and the hypophysis-pituitary axis (HPA). Previous studies have associated the adrenocortical overexpression of GIPR with postprandial aldosterone increase related to benign adrenocortical tumors. In healthy subjects the physiology of basal aldosterone related to the GIPR function and the mechanisms regulating aldosterone production after meal are largely unknown. Objective: To study plasma levels of both fasting and postprandial aldosterone in healthy subjects and to search associations between GIPR rs1800437 polymorphism and gender with adrenocortical mineralocorticoid secretion. Subjects and Methods: Peripheral blood samples were collected from 33 healthy and normotensive subjects, before (T0) and every 30 minutes (T30, T60, T90, T120 and T150) after the ingestion of a standard mixed meal, under HPA suppression by dexamethasone. Blood pressure, heart frequency, plasma concentrations of total aldosterone, renin and cortisol were measured in all time points. Genomic DNA was isolated for genotyping the GIPR rs1800437 polymorphism by PCR-RFLP assay. Results: We observed that fasting plasma aldosterone levels in women are higher than in men. In the postprandial period, there was an increase in plasma aldosterone in 11 individuals (35%), being independent of the RAS regulators in 5 of them (genotypes: 2=GG, 2=GC and 1=CC). Blood concentrations of aldosterone in the group of women who did not have the polymorphic C allele were higher than the others, both in fasting (ANOVA, $p=0.008$) and in the postprandial period (ANOVA, $p=0.008$). After feeding, the majority of individuals had aldosterone peaks at T90 and the greatest increment occurred at T150 (increases of 31.5% to 270% and 311% from basal, respectively) Conclusion: Increases of postprandial aldosterone occurred in nearly half of the subjects, showing that this isn't a rare adrenal response. We found an association between women and the absence of the polymorphic C allele with higher aldosterone blood concentrations, both fasting and feeding. Therefore, we suggest that GIP may be considered as a regulator of the aldosterone blood concentration and that different reference levels between women and men should be considered in the clinical evaluation of hyperaldosteronism.

Keywords: Adrenal córtex. Aldosterone. Gender. GIPR. Polymorphism. Postprandial. Renin-angiotensin-aldosterone axis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona	14
Figura 2 - Perfil circadiano da variação de aldosterona em 8 indivíduos saudáveis em jejum.....	16
Figura 3 - Estrutura do receptor do GIP.....	17
Figura 4 - Gene do receptor do GIP e seus principais polimorfismos.....	18
Figura 5 - Influência da ingestão do mixed meal em um paciente saudável.....	20

ARTIGO

Figure 1 –Flowchart showing the subjects’ classification according to RAS regulators, aldosterone post-prandial response and the presence of GIPR polymorphism rs1800437.....	39
Figure 2 - Basal plasma aldosterone according to gender and polymorphic C allele of 31 healthy subjects.	42
Figure 3 - Time course of fasting and postprandial aldosterone levels and aldosterone/cortisol ratio of a female (genotype: GG) healthy subject.....	43
Figure 4 - Postprandial aldosterone responses.	44
Figure 5 - Analysis of the association of gender and polymorphic C allele in healthy subjects’ postprandial plasma aldosterone	45
Figure 6 - Representative maximal postprandial increases of plasma aldosterone from basal levels of 11 subjects who had renin-independent aldosterone responses.....	46
Figure 7 - Time courses of postprandial aldosterone responses by gender and polymorphic C allele	47
Figure 8 - Time courses of postprandial aldosterone and renin basal levels from two polymorphism carriers who had renin independent aldosterone Response.....	48

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Clinical data, allele and genotype frequencies of <i>GIPR</i> gene of the studied subjects.....	40
Table 2 - Fasting glucose, aldosterone, renin, and blood pressure baseline of the studied subjects.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico	AMPc	-	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico	Ang II – angiotensina II
AT1R	receptor 1 de angiotensina II				
GIP	peptídeo insulíntrópico dependente de glicose				
GIPR	receptor do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose				
	RNAm – RNA mensageiro				
PCR	reação em cadeia da polimerase				
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>				
SNC	sistema nervoso central				
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único				
	SRA – sistema renina-angiotensina				
SRAA	sistema renina-angiotensina-aldosterona				

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 Glândulas adrenais.....	13
1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)	14
1.3 Peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP).....	16
1.4 Gene do receptor de GIP (GIPR)	17
1.5 Efeitos do polimorfismo rs1800437 do GIPR.....	18
1.6 GIPR e doenças adrenais	18
1.7 A alimentação na modulação da secreção de aldosterona	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Considerações éticas	23
3.2 Local do estudo	23
3.3 População e amostra.....	23
3.4 Critérios de inclusão e exclusão	23
3.5 Coleta das amostras de sangue e protocolo experimental.....	24
3.6 Análises bioquímicas.....	24
3.7 Análise molecular	25
3.7.1 Obtenção das amostras e do DNA genômico	25
3.7.2 Genotipagem por PCR-RFLP.....	25
3.7.3 Avaliação dos fragmentos de DNA.....	26
3.8 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6 REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1. Glândulas adrenais

As glândulas adrenais são importantes órgãos endócrinos envolvidos no desenvolvimento embrionário, na resposta ao estresse e no controle da pressão arterial. Elas estão localizadas acima dos rins, possuem forma piramidal e pesam entre 4 e 6 gramas em um adulto de peso médio. Elas são compostas por duas camadas: medula e córtex. A principal função das células medulares é produzir e secretar catecolaminas como a adrenalina e a noradrenalina. O córtex adrenal é dividido em 3 zonas: reticulada, fasciculada e glomerulosa. A camada mais interna denominada zona reticulada produz os hormônios androgênicos e os hormônios glicocorticóides em menor quantidade. Os glicocorticóides são produzidos, principalmente, na zona intermediária chamada fasciculada. Essa zona representa 75% do córtex adrenal. A zona glomerulosa é a camada mais periférica, corresponde a 15% da massa corticoadrenal e é responsável pela produção dos mineralocorticóides, dentre os quais a aldosterona é o principal hormônio (MAZZUCO; HERRERA; FONSECA, 2008).

A aldosterona tem como principal função o controle da pressão sanguínea a longo prazo através da regulação da homeostase de fluídos e eletrólitos (LARAGH; SEALEY, 2011). Ela desempenha sua principal função nos rins, especificamente na porção final do túbulo contorcido distal e ductos coletores.

Ao se ligar ao seu receptor nuclear, a aldosterona funciona como fator de transcrição gênica (LOTHER et al., 2015) e estimula a síntese de 1) canais de potássio, que permitem a eliminação de potássio pela urina de forma passiva; 2) canais de sódio apenas na parte luminal, responsável pela reabsorção do sódio; 3) bombas de sódio/potássio na superfície de toda a membrana das células renais, exceto na parte luminal, que estimulam a devolução do sódio à corrente sanguínea (PEARCE, 2001). Essas ações permitem a reabsorção de quase 100% do sódio filtrado. O influxo de sódio para o lúmen do vaso sanguíneo faz com que a água siga o mesmo sentido, levando ao aumento do volume circulante e, desta forma, aumentando a pressão vascular (BOOTH, 2002).

Através de marcadores de RNAm, foram identificadas células com receptores para angiotensina, renina e angiotensina II (ang II), que fazem parte

da sua via de ativação em diferentes tecidos (NEHME et al., 2015). O receptor de aldosterona está expresso, não só no rim, como em adrenais, colon, pele, glândula tireóide, tecido cardíaco, adiposo e muscular esquelético (CHADWICK et al., 2015).

1.2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

A síntese e a secreção de aldosterona são moduladas por três secretagogos: angII, potássio (K⁺) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Em menor proporção, fatores como a dieta com restrição de sódio e o ortostatismo podem ter ações estimulatórias ou inibitórias (MAZZUCO et al., 2010). A modulação do SRAA está sintetizada na Figura 1.

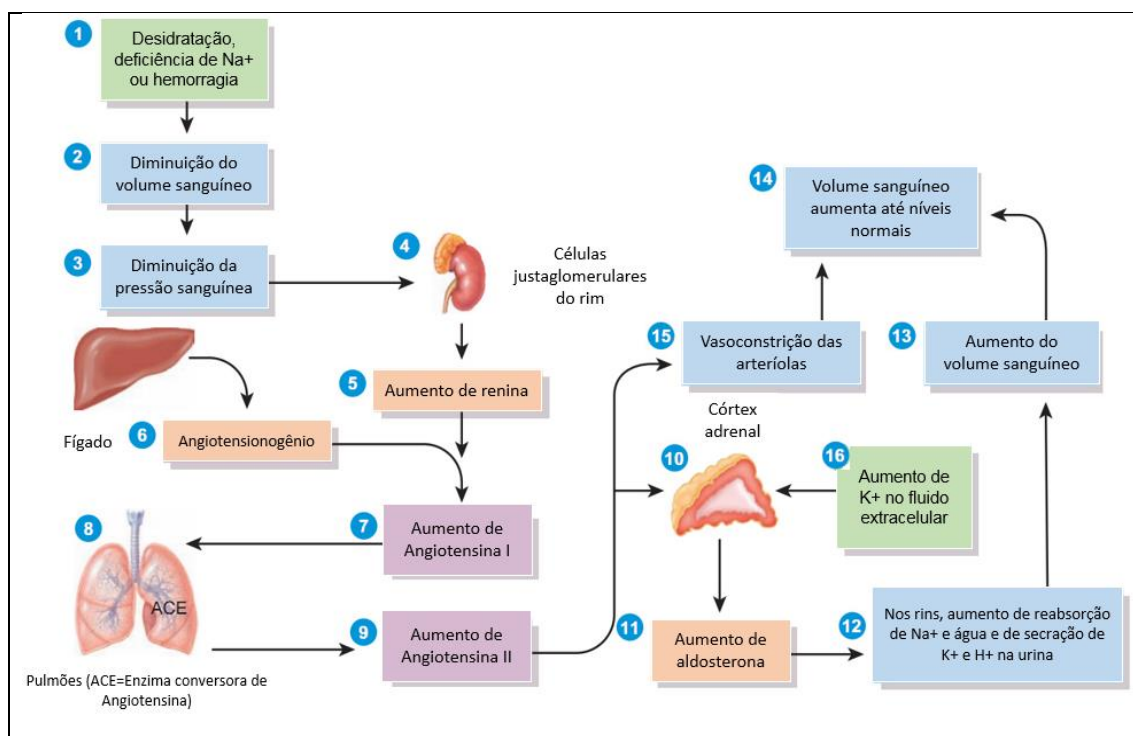


Figura 1: Modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A sequência numérica indica a ordem dos eventos

1.2.1. Angiotensina II

O estímulo mais significativo para a síntese de aldosterona é a AngII, que por sua vez é estimulada pela renina (Figura 1). Sua produção e secreção são controladas pelo aparelho justaglomerular, presente em cada néfron, o qual é

sensível à variação da quantidade de sódio intravascular, à diminuição da pressão sanguínea na arteríola aferente e à ativação simpática (MUNOZ-DURANGO et al., 2016). Ao se ligar ao receptor 1 de AngII (AT1R), presente no córtex da adrenal, a AngII ativa fosfolipases por intermédio da proteína G, aumentando a liberação de aldosterona (MAZZUCO et al., 2010).

1.2.2. Potássio

A secreção de aldosterona é regulada pela flutuação dos níveis sanguíneos de potássio. O aumento de K⁺ ativa canais de cálcio promovendo um influxo de cálcio e consequente produção de esteroides pelas células da zona glomerulosa (WILLIAMS, 2005). No entanto, sabe-se que a quantidade circulante de K⁺ é suficiente para equilibrar os níveis desse íon durante um período prolongado. Mesmo após meses de exposição a níveis elevados de aldosterona e consequente caliúria, sua concentração sérica pode permanecer dentro da faixa de normalidade (KATER, 2002).

Os principais responsáveis pela hipercalemia são: aumento da ingestão de K⁺ e hemólise, que normalmente acompanham falha renal; hipoaldosteronismo; desidratação severa e administração de beta-bloqueadores, alguns diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas de angII (LEHNHARDT; KEMPER, 2011).

1.2.3. Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)

Quando há uma intensa diminuição da concentração de sódio intravascular, há estímulo para liberação de ACTH, que age sinergicamente à Ang II e a hipercalemia para estimular as células da zona glomerulosa a liberarem aldosterona (SPAT; HUNYADY, 2004). Além disso, o ACTH possui um ritmo circadiano controlado pelo hipotálamo, apresentando um pico principal pela manhã, o qual estimula a secreção diária de cortisol e de aldosterona (MAZZUCO et al., 2010).

1.2.3. Renina

A renina é um fator limitante no SRAA. Os principais fatores responsáveis pelo aumento da produção desse hormônio são: hemorragias, desidratação, diminuição das concentrações de sal, posição ortostática e vasoconstrição das

artérias renais. Inversamente, agentes vasoconstritores periféricos, decúbito dorsal e altas concentrações de sal inibem a produção de renina (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). As variações fisiológicas da renina e da aldosterona são pouco abordadas em estudos recentes. Em um estudo de hiperaldosteronismo primário, 8 indivíduos saudáveis foram utilizados como controle (Figura 2), sendo que seis deles apresentaram aumento da renina trinta minutos após o ortostatismo. Somente 3 deles, apresentaram resposta positiva (aumento superior a 50%) de aldosterona.

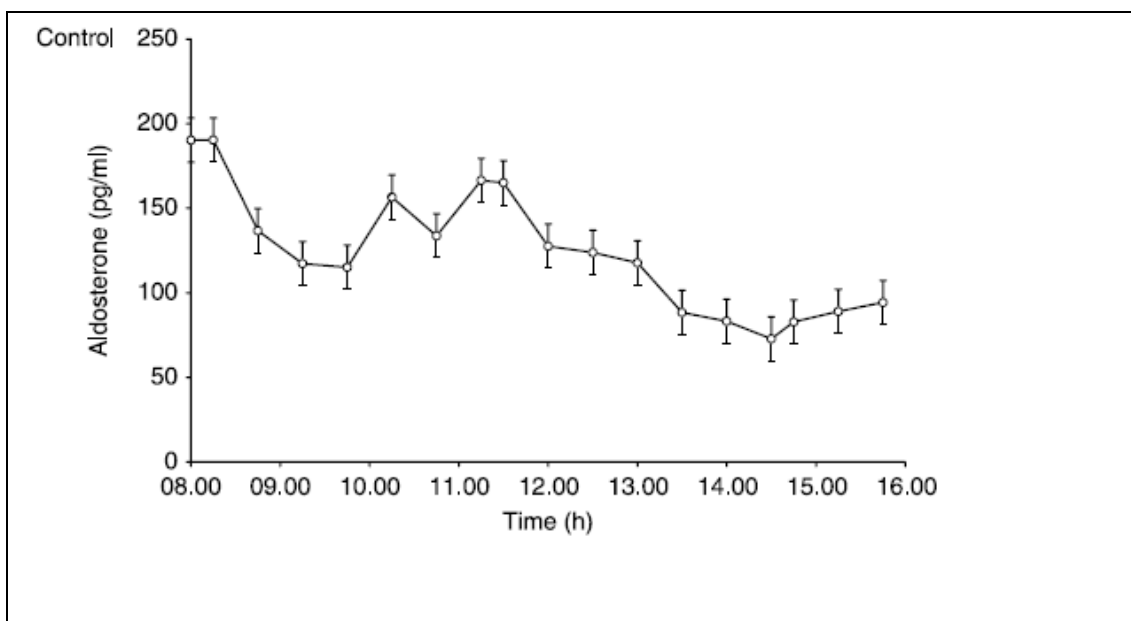


Figura 2: Perfil circadiano da variação de aldosterona em 8 indivíduos saudáveis em jejum. Fonte: (ZWERMANN et al., 2009).

1.3. Peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP)

A primeira incretina descrita foi o GIP. Incretinas são hormônios produzidos pelas células K do intestino e liberados na corrente sanguínea em resposta à ingestão alimentar. Elas são responsáveis pela liberação de até 50% da insulina estimulada por ingestão de glicose. Essa capacidade moduladora da produção de insulina é conhecida como efeito incretina e ocorre, normalmente após 30 minutos após alimentação.

O GIP tem como principal papel o efeito insulínico em células beta pancreáticas e seus efeitos adicionais incluem:

- Homeostase glicêmica e controle de peso (MIYAWAKI et al., 2002);

- Lipogênese em adipócitos (MIYAWAKI et al., 2002);
- Aumento da secreção da lipoproteína lipase (HANSOTIA et al., 2007; KIM; NIAN; MCINTOSH, 2007);
- Estimulação da secreção de somatostatina e glucagon (BECK, 1989; FEHMANN; GOKE; GOKE, 1995);
- Regulação do fluxo sanguíneo (FEHMANN et al., 1995);
- Remodelação óssea (GAUDIN-AUDRAIN et al., 2013).
- Neurogênese (FIGUEIREDO et al., 2011).

1.4. Gene do receptor de GIP (GIPR)

O receptor do GIP é codificado pelo gene denominado *GIPR* que possui aproximadamente 13.8 kb de comprimento e 14 exons (YAMADA et al., 1995), localizados na posição q13.3 do cromossomo 19 em humanos (GREMLICH et al., 1995). A presença do alelo polimórfico C (o qual substitui o alelo selvagem G) induz a troca não conservativa do glutamato (Glu) pela glutamina (Gln) na posição 354 (Glu354Gln), presente no domínio 6 da transmembrana (Figura 3) (SAUBER et al., 2010). Estudos funcionais que analisam o impacto dessa alteração do receptor ainda não foram publicados.

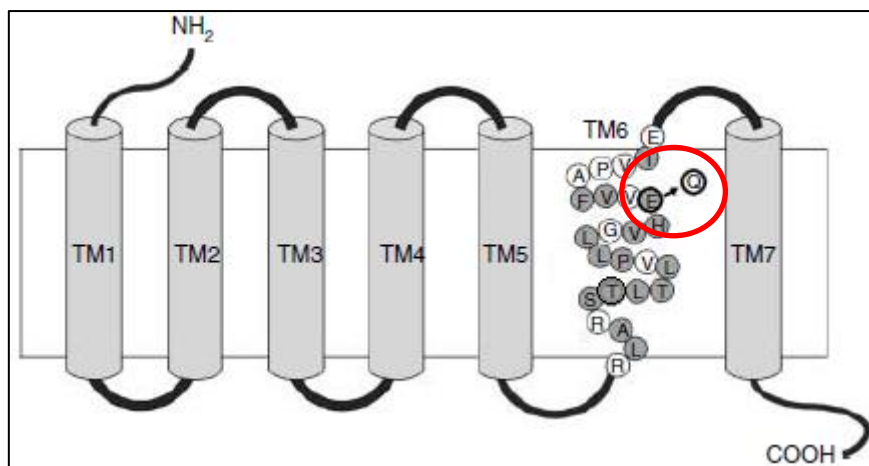


Figura 3. Receptor do GIP (GIPR). Estrutura da proteína do GIPR com a troca dos aminoácidos da variante rs1800437 destacada com o círculo vermelho. Fonte: (SAUBER et al., 2010).

O GIPR é membro da família de receptores acoplados a proteína G. Ele é expresso em vários órgãos: pâncreas, estômago, intestino, coração, pulmão,

hipófise, cérebro (CECCARELLI et al., 2013) (HANSOTIA; DRUCKER, 2005), córtex adrenal, tecido adiposo e ósseo (HANSOTIA; DRUCKER, 2005; YIP et al., 1998).

1.5. Efeitos do polimorfismo rs1800437 do *GIPR*

Apesar do gene do GIPR ter sido caracterizado como importante para a regulação da homeostase glicêmica e do controle de peso, ainda não há consenso sobre o impacto de variantes moleculares como causas fisiopatológicas da obesidade (VOGEL et al., 2009).

Estudos associam o alelo recessivo do polimorfismo de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – *SNP*) rs1800437 do *GIPR* com a resistência insulínica (SAUBER et al., 2010).

Já foi demonstrada redução significativa da atividade basal do GIPR e diminuição da expressão na membrana celular desse receptor causada por essa variante (FORTIN et al., 2010).

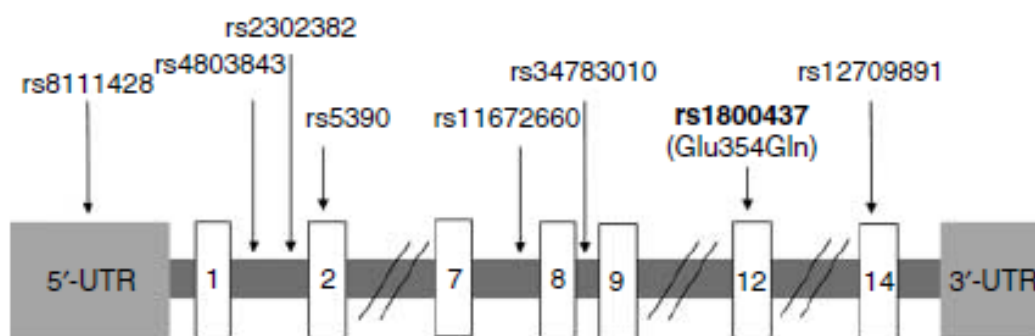


Figura 4. Gene do GIPR e seus polimorfismos. Estrutura do gene *GIPR* com a localização dos principais polimorfismos conhecidos. A variante rs1800437, localizada no exon 12 do gene *GIPR*, está destacada em negrito. Fonte: (SAUBER et al., 2010).

1.6. GIPR e doenças adrenais

Doenças adrenais com hiperprodução hormonal decorrem de uma falha na regulação do mecanismo de inibição dos receptores, que permanecem ativados independente da presença da molécula ligante ou da ativação dos receptores por ligação inespecífica de outras moléculas, ou pela expressão aumentada de receptores ligados a proteína G que, quando ativados, estimulam

a estereidogese, via ativação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) (LACROIX et al., 2004; LACROIX et al., 2001).

Estudos recentes têm atribuído um papel relevante do SRAA na fisiopatologia da hipertensão sistêmica ou periférica e em outras doenças cardiovasculares e renais. A hiperprodução de cortisol e aldosterona está relacionada com a hiperexpressão de alguns receptores acoplados a proteínas G, dentre eles o GIPR em aldosteronoma, hiperplasias adrenais macronodulares independentes de ACTH e adenomas adrenocorticais produtores de andrógenos ou causadores de síndrome de Cushing (LAMPRON et al., 2009).

Experimentos de imunohistoquímica, RT-PCR (LACROIX et al., 2001; LAMPRON et al., 2006; N'DIAYE et al., 1998) e hibridização *in situ* em ratos (USDIN et al., 1993) comprovam a presença do GIPR na zona glomerulosa das células adrenais normais. Em humanos, essa expressão ocorre na ordem de 2 a 3 vezes menos do que na síndrome de Cushing dependente de GIP (N'DIAYE et al., 1998).

Apesar da relação da hiperprodução hormonal com a hiperexpressão do GIPR, nenhuma mutação foi encontrada em adrenais de pacientes com síndrome de Cushing dependente de GIP (ANTONINI et al., 2004; LACROIX et al., 2010).

1.7. A alimentação na modulação da secreção de aldosterona

O controle da secreção de mineralocorticóides e glicocorticóides, em certas situações patológicas, pode ser exercido por hormônios como o GIP. A fisiopatologia da síndrome de Cushing dependente da alimentação foi elucidada no estudo de tumores adrenais benignos com secreção elevada de cortisol em resposta à elevação dos níveis de GIP no período pós-prandial (COSTA et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que a hiperexpressão de GIPR é capaz de induzir a proliferação celular do córtex adrenal, com aumento da secreção de glicocorticóide em resposta ao GIP (MAZZUCO et al., 2006). Outro estudo demonstrou um caso de hiperaldosteronismo primário dependente da alimentação e responsivo ao GIP (LAMPRON et al., 2009).

Além da expressão significativa de GIPR em tumores adrenais, foi identificada a expressão do GIPR na camada mais externa do córtex da glândula adrenal não tumoral. Até o momento, nenhum estudo a avaliou a resposta de

expressão, porém é possível obter os dados de indivíduos controles de estudos com tumores adrenais benignos causando hiperaldosteronismo primário. Em um deles, nenhum indivíduo controle, dentre os 8 estudados, apresentou aumento de aldosterona após alimentação (ZWERMANN et al., 2009). No outro, a produção de aldosterona foi estimulada *in vivo* pela alimentação (Figura 5) (LAMPRON et al., 2009).

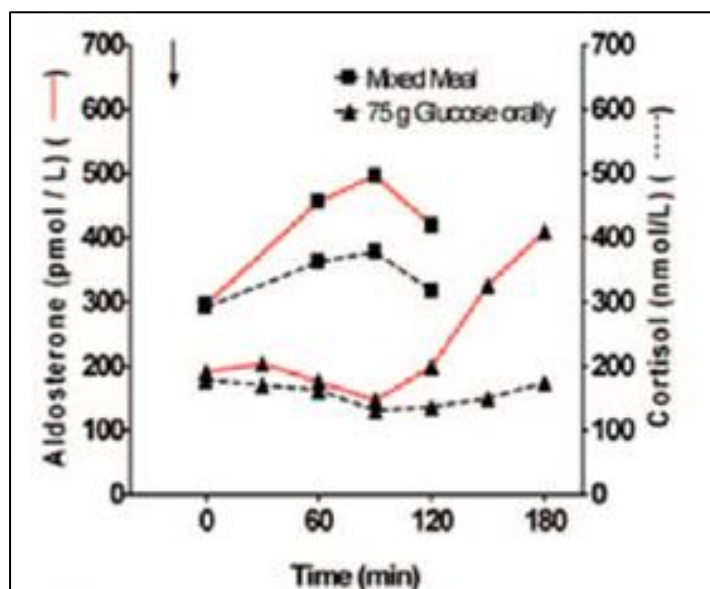


Figura 5: Influência da ingestão do mixed meal em um paciente saudável. Curvas de resposta de aldosterona de um paciente saudável após diferentes estímulos (ingestão de refeição e 75g de glicose oral). Retirado de (LAMPRON et al., 2009)

Estudos comprovam que a produção de aldosterona pode ser estimulada *in vivo* pela ingestão de refeições padrão (mesmo sem o estímulo do ACTH ou da renina). No entanto, os mecanismos envolvendo a regulação da secreção de aldosterona independente da ativação do SRA são pouco conhecidos, tanto em indivíduos doentes e menos ainda em indivíduos saudáveis.

A variabilidade genética entre os indivíduos explica as diferenças na sensibilidade à natremia na ativação do SRAA (LUFT; WEINBERGER, 1997). Os mecanismos para esse fato ainda não estão completamente elucidados.

A necessidade de mais estudos de caracterização da resposta adrenocortical em indivíduos saudáveis associada a polimorfismos do *GIPR* se deve a três motivos: 1) a existência de uma grande variabilidade na resposta fisiológica hormonal, tanto em jejum quanto em período pós-prandial; 2) a elevação do GIP pós-prandial, associada à existência de SNPs que conferem

atividades funcionais às variantes do GIPR e 3) estudos de mesma natureza em pacientes com doenças adrenocorticais revelam que a hiperexpressão do receptor do GIP é um evento genético suficiente para tumorigênese e diferenciação celular.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Descrever as variações da concentração de aldosterona plasmática em resposta à alimentação em indivíduos saudáveis e avaliar a influência do gênero e do polimorfismo rs1800437 do receptor do GIP.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença do polimorfismo rs1800437 do gene *GIPR* em indivíduos adultos saudáveis.
- Quantificar a aldosteronemia em período de jejum e fatores que podem causar variações fisiológicas.
- Avaliar as possíveis associações entre a aldosteronemia e a presença do alelo polimórfico do gene *GIPR*.
- Caracterizar a resposta pós-prandial de aldosterona sérica a cada 30 minutos até o tempo 150 minutos.
- Avaliar as possíveis associações entre a resposta fisiológica adrenocortical de aldosterona em diferentes períodos pós-prandiais, o gênero e a presença do alelo polimórfico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CEP/UEL nº024/2011; Registro CONEP 268/ Plataforma Brasil nº CAAE 0247.0.268.000-10). Todos os participantes voluntários receberam as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para posterior coleta do material biológico

3.2. Local do estudo

A coleta do sangue, a aferição da pressão arterial e frequência cardíaca foram realizadas na sala de testes da endocrinologia e a análise genética, no laboratório de pós-graduação, do Hospital Universitário de Londrina. A análise do polimorfismo foi realizada no laboratório de pós-graduação e a dosagem de glicose foi realizada pelo laboratório de bioquímica, do HURNP. As dosagens de aldosterona, cortisol e renina total foram realizadas pelo Laboratório Álvaro (Unidade Cascavel/PR).

3.3. População e amostra

Foram convidados a participar do estudo 33 indivíduos saudáveis adultos atendidos nos ambulatórios de endocrinologia do Hospital de Clínicas da UEL (HC/UEL) e outros voluntários da instituição, no período de agosto de 2011 a abril de 2012.

3.4. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: 1) idade maior que 18 anos; 2) índice de massa corpórea menor que 30 kg/m²; 3) ausência de comorbidade ou apenas portadores de hipotireoidismo em tratamento ou com níveis normais de hormônio tireoestimulante (TSH), ou hiperprolactinemia em tratamento, ambas doenças controladas há pelo menos 1 ano.

Os critérios de exclusão foram: 1) presença de história prévia de diabetes Mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia ou insuficiência adrenal primária ou

secundária; 2) uso de medicamentos com efeito no metabolismo glicêmico ou na regulação adrenal ou 3) não supressão do ACTH pela dexametasona (avaliados pelos níveis séricos de cortisol).

3.5. Coleta das amostras de sangue e protocolo experimental

Os indivíduos foram submetidos à punção de veia periférica com instalação de via de acesso para coleta de sangue. Todos permaneceram 15 minutos sentados antes da primeira coleta, denominada coleta basal ou T0. Em seguida, foi realizada a ingestão de 100 g de leite NAN Pro1 (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) diluídos em 300 mL de água. Essa refeição é composta por 58 g de carboidrato e 28 g de gordura (*mixed meal*) (HANSEN et al., 2011). Novas coletas de sangue foram realizadas nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos contados a partir do término da refeição (tempos T30, T60, T90, T120 e T150). Em todos os tempos foram verificadas as pressões arteriais e frequências cardíacas.

As coletas foram iniciadas pela manhã, após 10 h de jejum e tratamento com quatro comprimidos de dexametasona 0,5 mg de 6 em 6 horas a partir das 12 h do dia anterior ao experimento, a fim de excluir a possível interferência de variações fisiológicas dos níveis de ACTH, seguindo as mesmas doses do protocolo padrão utilizado no teste de supressão com dexametasona-2 mg, que é rotineiramente utilizado nos ambulatórios de endocrinologia para investigação de pacientes com suspeita de hipercortisolismo. As coletas foram realizadas em uma sala com ambiente calmo, climatizado e os indivíduos deveriam permanecer em posição sentada durante todo o teste.

O sangue foi mantido em gelo até o final das coletas, quando foram centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Os soros (dosagem de aldosterona e cortisol) e plasmas (dosagem de renina total) foram aliqüotados, congelados e encaminhados para os laboratórios.

3.6. Análises bioquímicas

A glicemia foi dosada pelo método da hexoquinase (Dimension Gluc, Siemens, Friemley, Camberley, UK).

Aldosterona foi dosada por radioimunoensaio, a atividade plasmática de renina por método imunofluorimétrico e o cortisol por quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Os valores de referência utilizados nesse trabalho foram: glicemia: 70 a 99 mg/dl, aldosterona: 4 a 31 ng/dL, renina total: 4,4 a 46,1 µUI/mL e cortisol: 3,7 a 19,4 µg/dL.

3.7. Análise molecular

3.7.1 Obtenção das amostras e do DNA genômico

Foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue em tubos previamente tratados com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e a camada leucocitária foi aliquoteada em tubos tipo *ependorf* e armazenadas em freezer a -20 °C até o momento da análise do polimorfismo.

O DNA foi extraído a partir de 200 µl de células leucocitárias utilizando kit de extração de DNA MiniSpin Plus (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Paraná, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 2000 c® Spectrophotometer (ThermoScientific, Wilmington, Dalaware, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. A integridade das amostras de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% à 100 V por 15 minutos, seguida de coloração com brometo de etídio e leitura sob luz ultravioleta.

3.7.2 Genotipagem por PCR-RFLP

A genotipagem foi realizada através da análise de polimorfismos por comprimento de fragmento utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pelo método de PCR- *Restriction Fragment Length Polymorphism* (FRLP), com uso da enzima de restrição BssSI.

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sense: 5' ATT ACC GGC GGT TGA GAG G 3' e anti-sense: 5' CTG GAA GGA GCT GAG GAA GA 3' já descritos anteriormente (VOGEL et al., 2009). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µM de cada *primer* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), 2,5 U Taq DNA polimerase, 50

mM de MgCl₂, 1,25 mM de dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) e 100 ng de DNA.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Multigene Optimax (Labnet, Edison, USA), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C; seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 94 °C para a desnaturação, 30 segundos a 62 °C para o anelamento, 30 segundos a 72 °C para extensão e 10 minutos a 72 °C para extensão final.

Para a determinação dos genótipos SNP rs1800437 foram realizadas reações de digestão dos produtos de PCR com 2,4 U da enzima de restrição BssSI (Biolabs, Ipswich, New England) por reação. Cada tubo, contendo um volume final de 10 µL foi submetido a banho seco à 37 °C por 3 horas.

3.7.3 Avaliação dos fragmentos de DNA

Após as etapas de PCR e digestão enzimática, a integridade dos fragmentos obtidos e a classificação dos genótipos foram avaliadas por meio de eletroforese com gel de agarose 3%, a 70 V por 30 minutos ou acrilamida 10%, a 100 V por 40 minutos, visualizados após coloração com brometo de etídio e com nitrato de prata, respectivamente.

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As variáveis categóricas foram expressas como número absoluto (n) e porcentagem (%) e analisadas utilizando teste Exato de Fisher. As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste *t* de Student e foram expressas como média ± desvio padrão (DP). Análises de mais de dois grupos foram feitas usando o teste *one-way* ANOVA, com os pós-testes de Tukey. Área sob a curva foi calculada para as curvas de resposta pós-prandiais. Todos resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma de um artigo científico, a ser submetido ao periódico *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, indexado ao Medline/PUBMED, classificado na categoria MEDICINA I da CAPES como Qualis B1.

Plasma aldosterone variations in healthy subjects: role of diet, gender and the rs1800437 *GIPR* polymorphism.

Natasha Guimarães Ludwig¹, Alexandro Márcio Mattos¹, Luciane Celeste-Lazari¹, Camila Motta Romero¹, Sarah Conchon¹, Marla Karine Amarante², Maria Angelica Ehara Watanabe², Tânia Longo Mazzuco^{1,*}

¹ Endocrinology Division of Medical Clinical Department, Health Science Center, Londrina State University, Londrina, Parana, Brazil.

²Laboratory of Genetic Polymorphism and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Science Center, Londrina State University, Londrina, Parana, Brazil

***Corresponding author:** Tânia Longo Mazzuco, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica Médica. Av. Robert Koch, 60, Londrina, PR, Brazil, 86038-350. Tel/Fax +55 43 3371-2328, e-mail: tmazzuco@uel.br or tmazzuco@gmail.com

Abstract

Background: Aldosterone secretion is mainly regulated by the renin-angiotensin system (RAS), potassium levels and the hypophysis-pituitary axis (HPA). Previous studies have associated the adrenocortical overexpression of GIPR with postprandial aldosterone increase related to benign adrenocortical tumors. In healthy subjects the physiology of basal aldosterone related to the GIPR function and the mechanisms regulating aldosterone production after meal are largely unknown.

Objective: To study plasma levels of both fasting and postprandial aldosterone in healthy subjects and to search associations between *GIPR* rs1800437 polymorphism and gender with adrenocortical mineralocorticoid secretion.

Subjects and Methods: Peripheral blood samples were collected from 33 healthy and normotensive subjects, before (T0) and every 30 minutes (T30, T60, T90, T120 and T150) after the ingestion of a standard mixed meal, under HPA suppression by dexamethasone. Blood pressure, heart frequency, plasma concentrations of total aldosterone, renin and cortisol were measured in all time points. Genomic DNA was isolated for genotyping the *GIPR* rs1800437 polymorphism by PCR-RFLP assay.

Results: We observed that fasting plasma aldosterone levels in women are higher than in men. In the postprandial period, there was an increase in plasma aldosterone in 11 individuals (35%), being independent of the RAS regulators in 5 of them (genotypes: 2=GG, 2=GC and 1=CC). Blood concentrations of aldosterone in the group of women who did not have the polymorphic C allele were higher than the others, both in fasting (ANOVA, $p=0.008$) and in the postprandial period (ANOVA, $p=0.008$). After feeding, the majority of individuals had aldosterone peaks at T90 and the greatest increment occurred at T150 (increases of 31.5% to 270% and 311% from basal, respectively)

Conclusion: Increases of postprandial aldosterone occurred in nearly half of the subjects, showing that this isn't a rare adrenal response. We found an association between women and the absence of the polymorphic C allele with higher aldosterone blood concentrations, both fasting and feeding. Therefore, we suggest that GIP may be considered as a regulator of the aldosterone blood

concentration and that different reference levels between women and men should be considered in the clinical evaluation of hyperaldosteronism.

Keywords: Adrenal cortex, aldosterone, gender, GIPR, polymorphism, postprandial, renin-angiotensin-aldosterone axis

Introduction

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is a very complex regulatory system responsible for salt conservation, blood volume and blood pressure (BP) regulation. Briefly, in response to certain stimuli, renin, a proteolytic enzyme produced by the kidneys cleaves angiotensinogen into angiotensin I (Ang I), which has no biological action itself, but can be converted to the active protein angiotensin II (Ang II) by the angiotensin-converting enzyme. Finally, Ang II binds to specific cell surface angiotensin-receptors on adrenal glands promoting aldosterone's secretion (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Although aldosterone is mainly regulated by RAAS, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and potassium, GIP has recently added to the list of other regulators of aldosterone which also include serotonin, vasopressin, dopamine, endothelin and atrial natriuretic factor (MAZZUCO et al., 2010; SPAT; HUNYADY, 2004).

It has been shown that overexpression of the GIP receptor gene (*GIPR*) in adrenal cells is a sufficient genetic event to initiate tumorigenesis, as well as hormone overproduction (MAZZUCO et al., 2006). It was first associated with an abnormal expression of some G-protein coupled receptors in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) and adrenocortical adenomas causing Cushing's syndrome or primary aldosteronism. GIP can also stimulate renin-independent aldosterone secretion in normal primary adrenal cell cultures (*in vitro* experiments), after ingestion of mixed meals or by GIP infusion in patients with benign adrenocortical tumors or AIMAH (LACROIX et al., 2010; LAMPRON et al., 2009). In all cases, the mechanisms regulating aldosterone production were ACTH and potassium independent.

In healthy subjects the mechanisms regulating aldosterone production other than the classical regulators ACTH, RAAS and potassium, are largely unknown. In two studies of primary aldosteronism, some data about the increase of aldosterone influenced by feeding can be found in control subjects for the clinical protocol of adrenal aberrant receptors. (LAMPRON et al., 2009; ZWERMANN et al., 2009). The aim of this study was to describe the plasma levels of basal and to search postprandial aldosterone response in healthy subjects and to search possible associations between *GIPR* rs1800437 polymorphism and gender on adrenocortical function.

Material and Methods

Human subjects and blood samples collection

This study included 14 men and 19 women in all phases of menstrual cycle, aged from 18 to 64 years. All of them were healthy, non-diabetic and normotensive. Every participant provided an informed consent and all procedures were carried out under research protocols approved by the Institutional Review Board of the National Institute of Child Health & Human Development (Bethesda, MD, USA) and by the Human Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil (HEC/UEL number: 024/2011).

All subjects had 0.5 mg of dexamethasone orally 6/6 h, in order to keep the ACTH suppressed. The whole experimental procedures were performed between 7 am and 10 am, after 10 hour fasting and the subjects remained seated. The first blood sample was collected after at least 15 minutes in this position and it was followed by the ingestion of a standard mixed meal (58 g carbohydrate and 28 g lipids). The subsequent blood samples were obtained during 2:30 hours (T30 – T150) within intervals of 30 min, counted from the beginning of meal ingestion. Blood pressure and serum levels of aldosterone, total cortisol and renin activity were measured in all times. The blood sample's buffy coats were separated by centrifugation and properly storage at -20 °C for genotyping assays.

Biochemical assays

Plasma glucose concentrations were evaluated using a biochemical *auto-analyzer* (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA) using Dade Behring kits. Plasma insulin concentrations were measured by quimioluminescence (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Genotyping assays

Genomic DNA was extracted from 200 µL peripheral leukocytes using the Biopur kit (Biometrix Diagnostica Ltda, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's protocol, and stored at -20 °C until genotyping. The DNA samples

were also quantified by a NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) at 260 nm. The absorbance ratios 260/280 nm and 260/230 nm were used to determine the purity of the samples.

The *GIPR* rs1800437 polymorphism was identified by the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay. PCR reaction was performed in a final volume of 25 μ L using 1.25 μ M dNTP, 50 μ M MgCl₂, 2.5 μ L 10X PCR Buffer, 2.5 μ M from each primer and 1.25 units of Taq DNA polymerase Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). 0.2 μ M each primer: sense 5' ATT ACC GGCGGT TGA GAG G 3' and antisense 5' CTG GAA GGA GCT GAG GAA GA 3' (VOGEL et al., 2009), and 100 ng of genomic DNA. The PCR conditions were: 5min denaturation at 95 °C, 30 cycles of 45 seconds at 94 °C, 45 seconds at 62 °C, 45 seconds at 72 °C, and 10 minutes' elongation at 72 °C.

PCR products were digested with 1U BssSI restriction enzyme (Biolabs, New Ipswich, NH, New England) at 37°C for 3h, and the products were a 245 bp fragment (for mutated allele) or 150 and 95bp fragment (for wild-type) that were analyzed on polyacrylamide gel (10%) and stained with silver nitrate (AgNO₃). Negative controls were employed to make sure that no contaminants were introduced.

Statistical analysis

GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Prism Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to analyze all dataset. Continuous variables were presented as means more or less the standard deviation (SD) and categorical variables as counts (n) and percentages. Comparisons between groups were assessed Student *t*-test for continuous variables. Analysis of more than one variable were done using one-way ANOVA, with Tukey's posttest. Area under the curve (AUC) was calculated for all postprandial curve analysis. P-values<0.05 were considered statistically significant.

Results

Clinical and biomolecular analysis

Aldosterone responses to feeding were performed in 33 individuals. Two of them (one of each gender) were excluded because cortisol response curves presented inadequate inhibition of ACTH by dexamethasone (figure 1). The mean age of participants was 27.8 ± 10 (18-64) years, with the majority (58%) being women (table 1). Despite the difference ($p < 0,01$) in BMI between genders, no obesity was found among the subjects, with 27.3 kg/m^2 being the maximum BMI. Most individuals had the wild type allele (G) in homozygous (allelic frequencies: $q^2 = 0.128$, genotype frequencies: $q^2 = 0.146$) for rs1800437 of GIPR (table 1). No subject had diabetes and the mean systolic / diastolic blood pressure (\pm SD) was $108 (\pm 10) / 70 (\pm 7)$ mmHg in the fasting state, and all individuals were normotensive by the time of tests (table 2).

Aldosterone physiology in fasting period

Total plasma aldosterone at basal time (T0) differed between genders, with women showing higher amounts of circulating hormone ($p=0.008$). The aldosterone/ renin ratio revealed a trend of difference between genders ($p=0.058$). This difference was also observed in the systolic blood pressure, which is higher in men, but was not observed in the other biochemical tests (table 2).

Considering the difference found between genders, an analysis of the levels of basal aldosterone and its association with the presence of the polymorphic allele (C) was performed in this context. We found a high basal aldosterone secretion of the C- female group comparing to the others (figure 2).

The time course of the same parameters studied in table 2 without the food stimulus and the most common genotype (GG) are shown in figure 3.

Postprandial variation in plasma aldosterone

In the postprandial period, there was an increase in plasma aldosterone in 11 subjects (35%), and it's independent of the renin-angiotensin axis regulators in 5 of them (3 subjects with polymorphic C alleles) (figure 1).

Peak responses had a mean aldosterone of $114.1\% \pm 98.5$ ($n = 11$). The mean nadir of aldosterone was 57.9% with a minimum nadir of 37.5% (figure 4A).

The variations of aldosterone by time are shown in figure 4B, and the nadir values were equally distributed at all times.

Analysis of gender and GIPR polymorphism on aldosterone postprandial variations

Stratifying the original sample by gender and presence of polymorphic allele, we observed that the time course presented the same pattern of differences found in the fasting period ($p=0.008$). We also found that the group with the greatest variations of aldosterone were women who did not have the polymorphic allele (C- Female) (figure 5A and B).

Most postprandial response peaks occurred in T90, however, largest increments over baseline are noted in T150 (figure 6). The largest delta in women, the types of response by gender and allele are represented in figure 7.

In the flowchart (figure 1), several physiological stimuli for aldosterone secretion were evaluated until the influence of the presence of the polymorphism on the postprandial aldosterone response was evaluated. From 3 patients who had aldosterone response stimulated exclusively by feeding (figure 1), one of each gender is represented in figure 8.

Discussion

Based on the role of aberrant hormone receptors in regulating steroidogenesis in adrenal tumors or AIMAH secretion of cortisol or androgen, we adapted the protocol for adrenal aberrant receptors to evaluate the physiological aldosterone response to the GIP secretion induced by the ingestion of a mixed meal. We demonstrated that gender and *GIPR* rs18000437 polymorphism influences the plasma aldosterone concentration and the aldosterone response is characterized by a postprandial increase in some individuals.

Our recent study evaluated the prevalence of *GIPR* polymorphism rs1800437 in Londrina (Brazil) (DA SILVA MATTOS) and we have found similar allelic and genotypic frequencies in this study.

Studies have shown that both blood pressure and steroid hormones are related to higher secretion of aldosterone in women. Total aldosterone consists in its free parts and attached portions to corticosteroid binding globulin (CBG) protein. It is known that estrogen is able to increase the amount of CBG and, consequently, the aldosterone (NOWACZYNSKI et al., 1987). In addition, constitutively, fertile women present a compensatory activation of RAS axis due to the increase of progesterone in the luteal phase of the menstrual cycle (SZMUILOWICZ et al., 2006) and lower blood pressure than men (RECKELHOFF; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000).

The difference found between systolic blood pressure between gender is not related (data not shown) to the fact that women have surprisingly presented higher levels of plasma aldosterone. In order to eliminate the influence of the circadian effect of ACTH stimulation on the adrenal cortex, the plasma aldosterone was normalized to plasma cortisol and this ratio did not differ, which can be explained by both hormones being dosed in their entirety, which cancels the effect of CBG induced by estrogen.

The aldosterone/renin ratio tended to be higher in women, demonstrating that the difference of total aldosterone is not due to renin levels; aldosterone/cortisol ratio didn't differ between gender because of ACTH suppression. Through flowchart (figure 1) we can suppose the relationship between food intake and adrenal response, since 5 subjects (2 with wild type allele) presented aldosterone secretion after ingestion of a mixed meal (mean = $174.2 \pm 122.9\%$), without the influence of ACTH, blood pressure or renin variations.

It is also observed that the group with the greatest increments of aldosterone was women who had the wild type allele in homozygous (C- female). Some studies show that the presence of *GIPR* rs18000437 polymorphism is related to higher plasma glucose 2 hours after glucose ingestion, as well as lower insulin secretion after an oral glucose tolerance test and lower levels of *GIPR* mRNA in human pancreatic islets. This suggests that the variant encoding *GIPR* 354Gln decreases the effect of GIP (FORTIN et al., 2010; SAUBER et al., 2010; SAXENA et al., 2010). *GIPR* can be found and is expressed on the surface of cells off zona glomerulosa cells and is able to stimulate the production of aldosterone in postprandial periods, independent of the activation of RAS

(LACROIX et al., 2001; N'DIAYE et al., 1998). We suggest a possible relation of the polymorphism with the secretion of this hormone.

One of the indirect evidences of the increase in the amount of circulating GIP after feeding is the augmentation of glucose, which was evidenced in all individuals after T60, therefore, we disregard the aldosterone response curves at T30, since they are not related to feeding.

Both peaks and nadir aldosterone responses were variable (Figure 4). The aldosterone peak patterns found in this study (mean 150%, with higher peaks in T150) are similar to those found in previous studies: mean maximum increase of 68% (n=1) in relation to basal, with higher peaks between 90 and 120 (LAMPRON et al., 2009) and , 45% mean (2 of 8 subjects studied), with aldosterone nadir in the majority of subjects (mean=35.5%) (ZWERMANN et al., 2009). The aldosterone decreases below the baseline were not considered as a postprandial response but as a physiological decrease after the position change from orthostatic position to sitting position, confirmed by our negative control (figure 3).

Potassium was not dosed because the subjects were healthy and, therefore, did not have ion increasing factors (KATER, 2002); in addition, the mixed meal offered to all subjects had sodium and potassium controlled amounts. Six subjects stood up during the last two measures of the test. These hormone levels were not included in our analysis due to the interference of upright posture on blood pressure (decrease of 22% from upright to sitting position) (JACOB et al., 1998), and, therefore, on aldosterone response.

Conclusion

- In some healthy subjects, ingestion of a mixed meal, a stimulator of GIP, was sufficient to stimulate aldosterone secretion, without the interference of its modulators (ACTH, blood pressure and RAAS).
- The basal and postprandial aldosterone levels have differed between genders, which is enhanced by the absence of the *GIPR* polymorphism.
- We suggest that GIP may be considered as a regulator of the aldosterone blood concentration and that different reference levels between women

and men should be considered in the clinical evaluation of hyperaldosteronism.

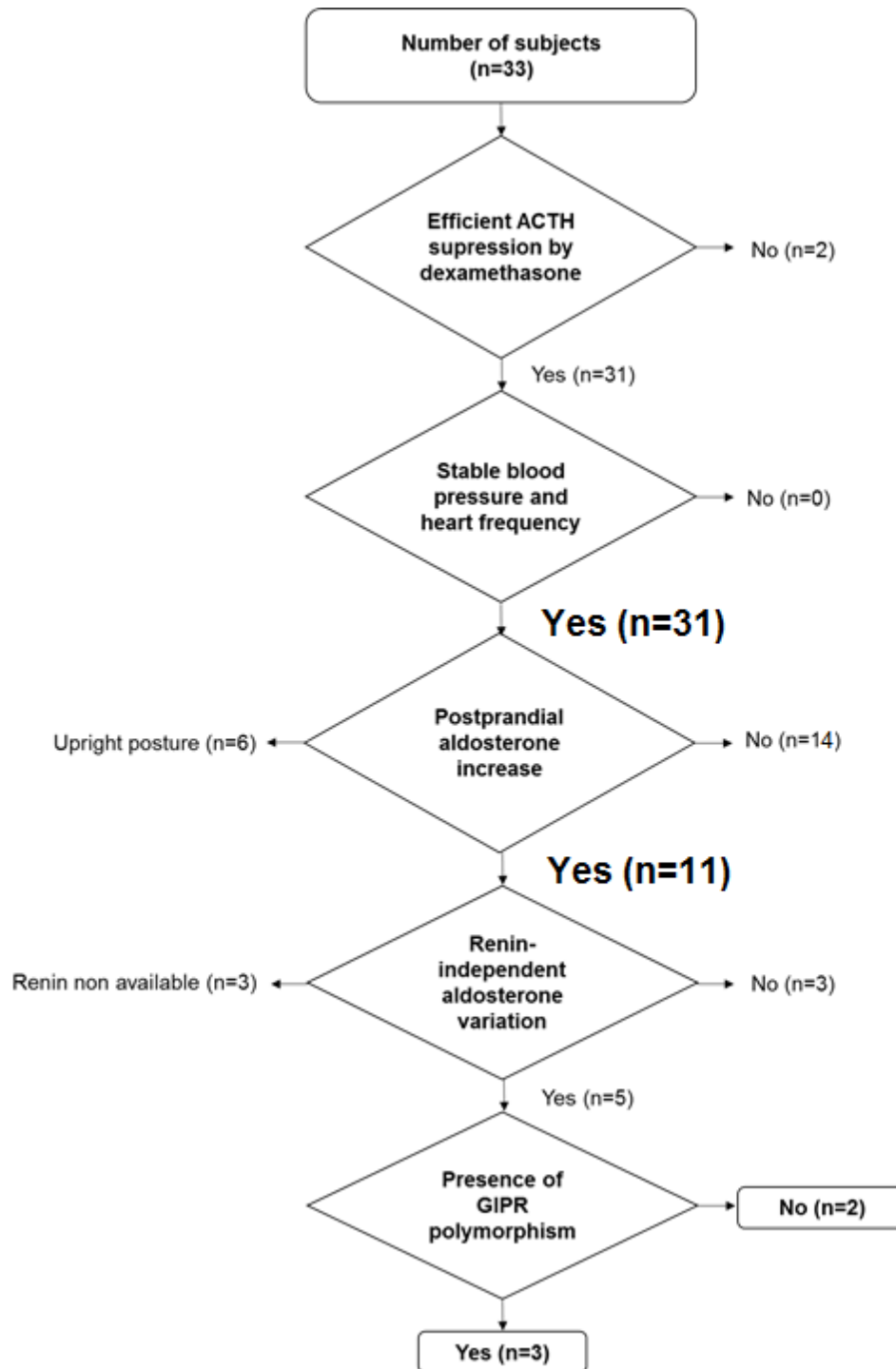


Figure 1: Flowchart showing the subjects' classification according to RAS regulators, aldosterone post-prandial response and the presence of GIPR polymorphism rs1800437.

Table 1: Clinical data, allele and genotype frequencies of *GIPR* gene of the studied subjects.

	Total (n=31)	Female (n=18)	Male (n=13)
Age (yr)	27.8 ± 10	29.1 ± 11	26 ± 7.6
BMI (kg/m ²)	22.1 ± 2.7	21 ± 2.5	23.6 ± 2.3
Polymorphic allele			
C-	19 (61%)	9 (50%)	10 (77%)
C+	12 (39%)	9 (50%)	3 (23%)
Genotype			
GG	19 (61%)	9 (50%)	10 (77%)
GC	8 (26%)	5 (28%)	3 (23%)
CC	4 (13%)	4 (22%)	0 (0%)

BMI: body mass index. The values are shown as mean ± SD. The absence and the presence of the polymorphic C allele of *GIPR* are represented as C- and C+, respectively.

Table 2: Fasting glucose, aldosterone, renin, and blood pressure baseline of the studied subjects.

	Total (n=31)	Female (n=18)	Male (n=13)
Biochemical data			
Glucose (mg/dL)	91.5 ± 9.4 (30)	91.7 ± 10 (17)	91.2 ± 8.9 (13)
Aldosterone (ng/dL)	15.9 ± 12.9 (31)	20.9 ± 14.6 (18)	8.9 ± 5 (13)
Renin (μUI/mL)	19.3 ± 13.1 (20)	18.6 ± 10.9 (12)	20.4 ± 16.6 (8)
Aldosterone/renin	0.9 ± 0.8 (20)	1.2 ± 1 (12)	0.6 ± 0.5 (8)
Aldosterone/cortisol	17.1 ± 20.9 (28)	21 ± 25.6 (17)	11.2 ± 8.4 (11)
Cortisol (μg/dL)	1.1 ± 0.6 (28)	1.3 ± 0.6 (17)	0.8 ± 0.1 (11)
Blood pressure			
SBP (mmHg)	108.4 ± 9.9 (29)	104 ± 6.2 (16)	114 ± 11 (13)
DBP (mmHg)	70.1 ± 7.3 (29)	69.4 ± 6.8 (16)	71.9 ± 7.5 (13)
MBP (mmHg)	83.1 ± 7.4 (29)	80.8 ± 5.9 (16)	85.9 ± 8.3 (13)

SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, MBP: mean blood pressure. All data are shown as mean ± SD (n). Student *t*-test.

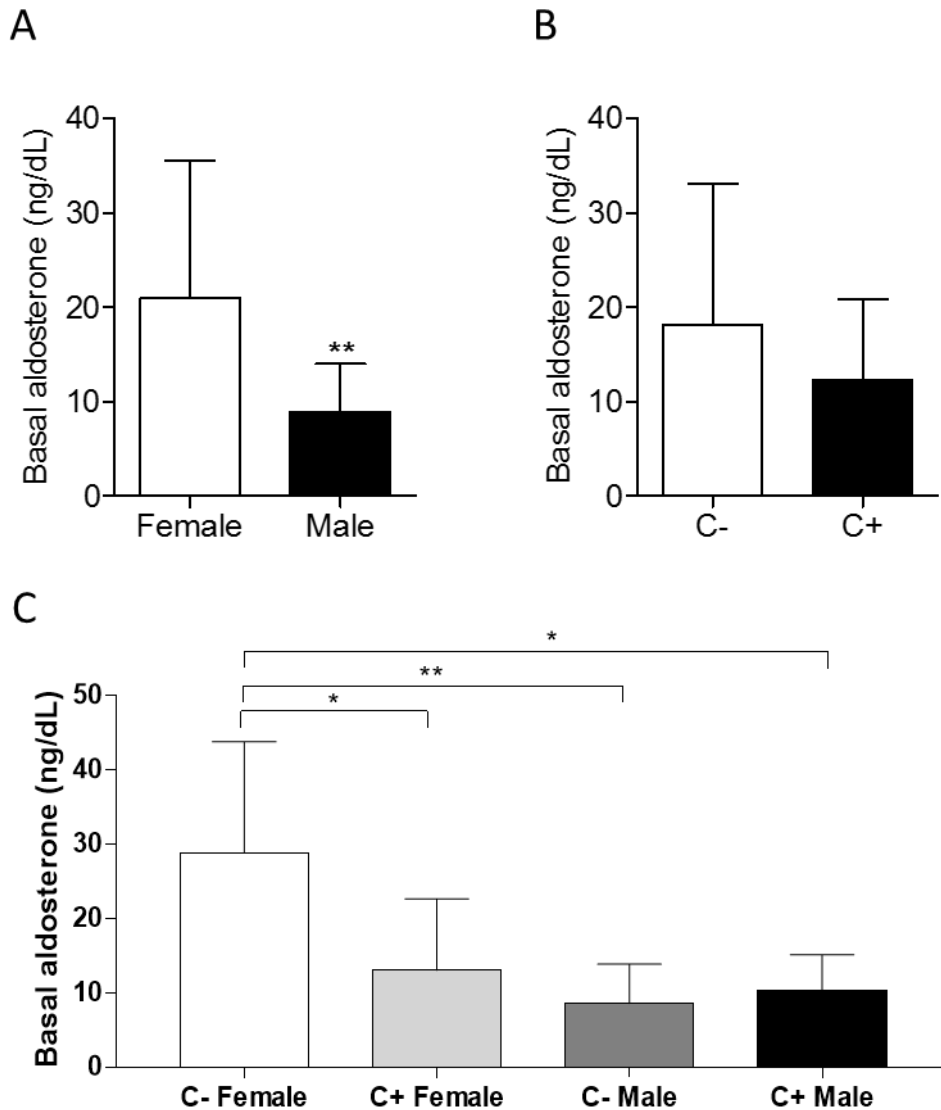


Figure 2: Basal plasma aldosterone according to gender and polymorphic C allele of 31 healthy subjects. **A:** Basal plasma aldosterone according to female and male subjects (n=18 and n=13, respectively). ** $p=0.008$; Student *t*-test. **B:** Basal plasma aldosterone according to the absence and the presence of *GIPR* polymorphic C allele (n=19 and n=12, respectively). $p=0.226$; Student *t*-test. **C:** Basal plasma aldosterone according to gender-polymorphic C allele (C- Female: n=9; C+ Female: n=9; C- Male: n=10; C+ Male: n=3). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$; ANOVA with Tukey's post-test. All results are shown as mean \pm SD. The absence and the presence of the polymorphic C allele of *GIPR* are represented as C- and C+, respectively.

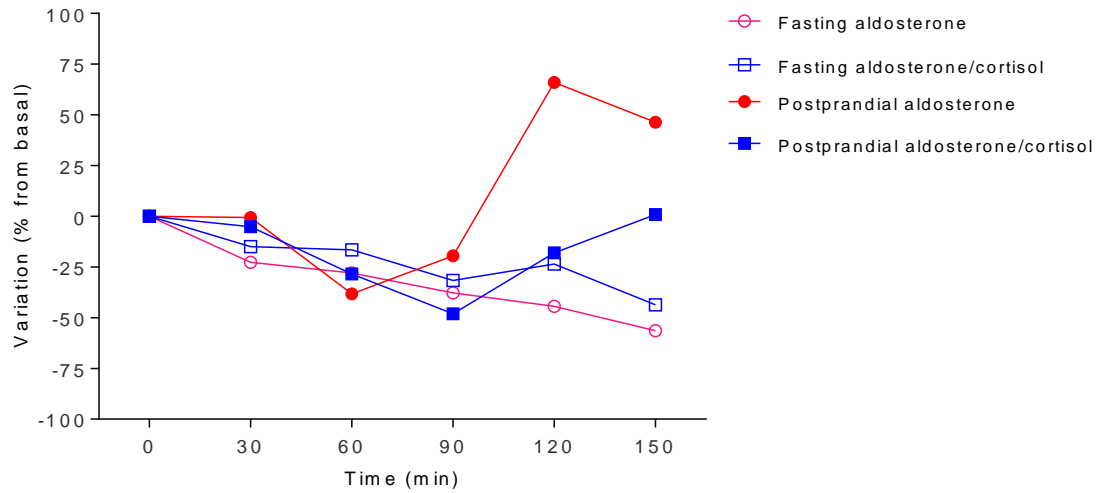


Figure 3: Time course of fasting and postprandial aldosterone levels and aldosterone/cortisol ratio of a female (genotype: GG) healthy subject. Heart frequencies, blood pressure, renin levels didn't interfere in aldosterone responses.

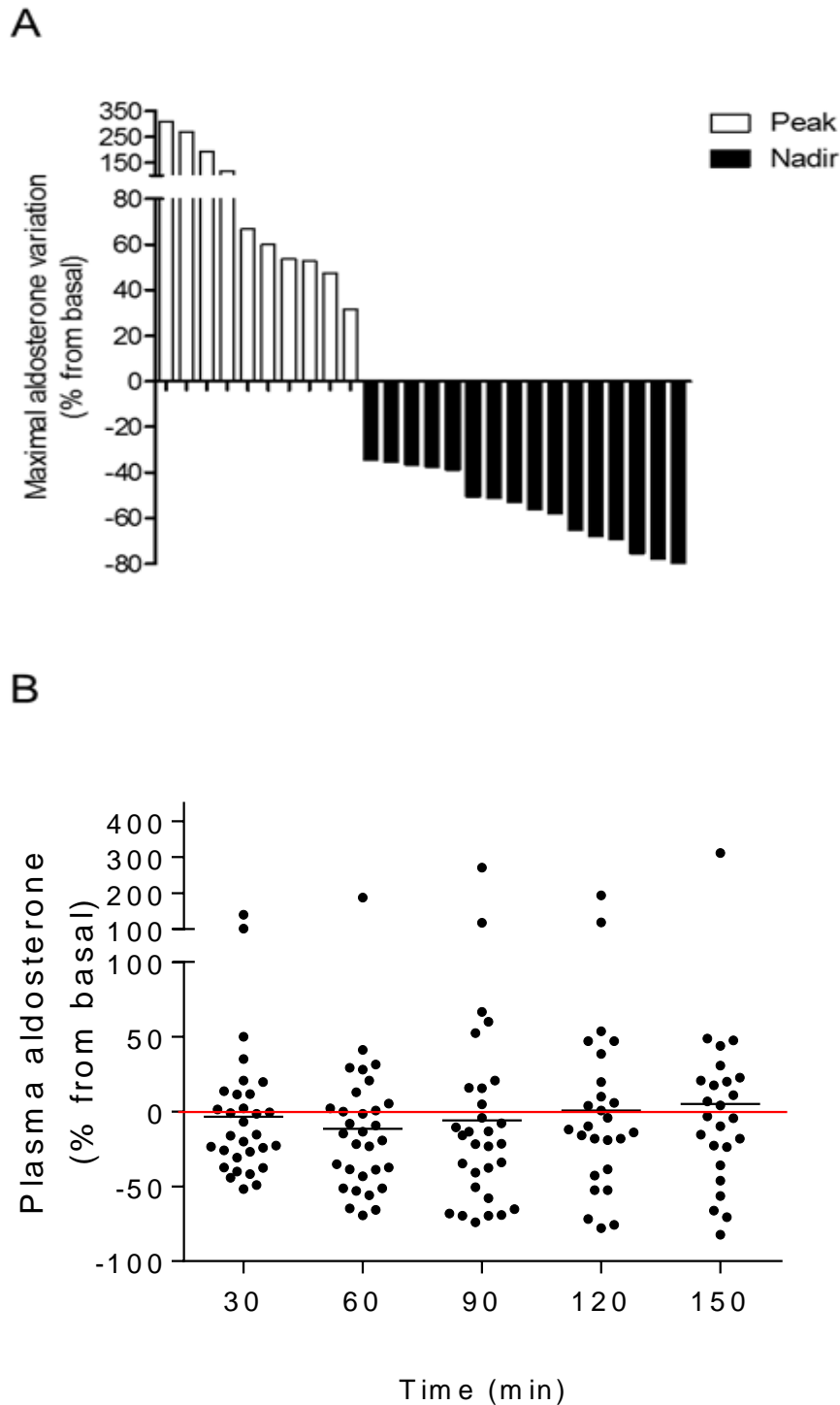


Figure 4: Postprandial aldosterone responses. **A:** Representative maximal aldosterone responses. Each bar indicates an individual aldosterone peak or nadir. **B:** Postprandial plasma aldosterone percentage from basal in all time points. The red line indicates the baseline. In each period of time, horizontal lines represent median values of plasma aldosterone (and the points indicate the individual aldosterone variation, compared to the baseline (0%).

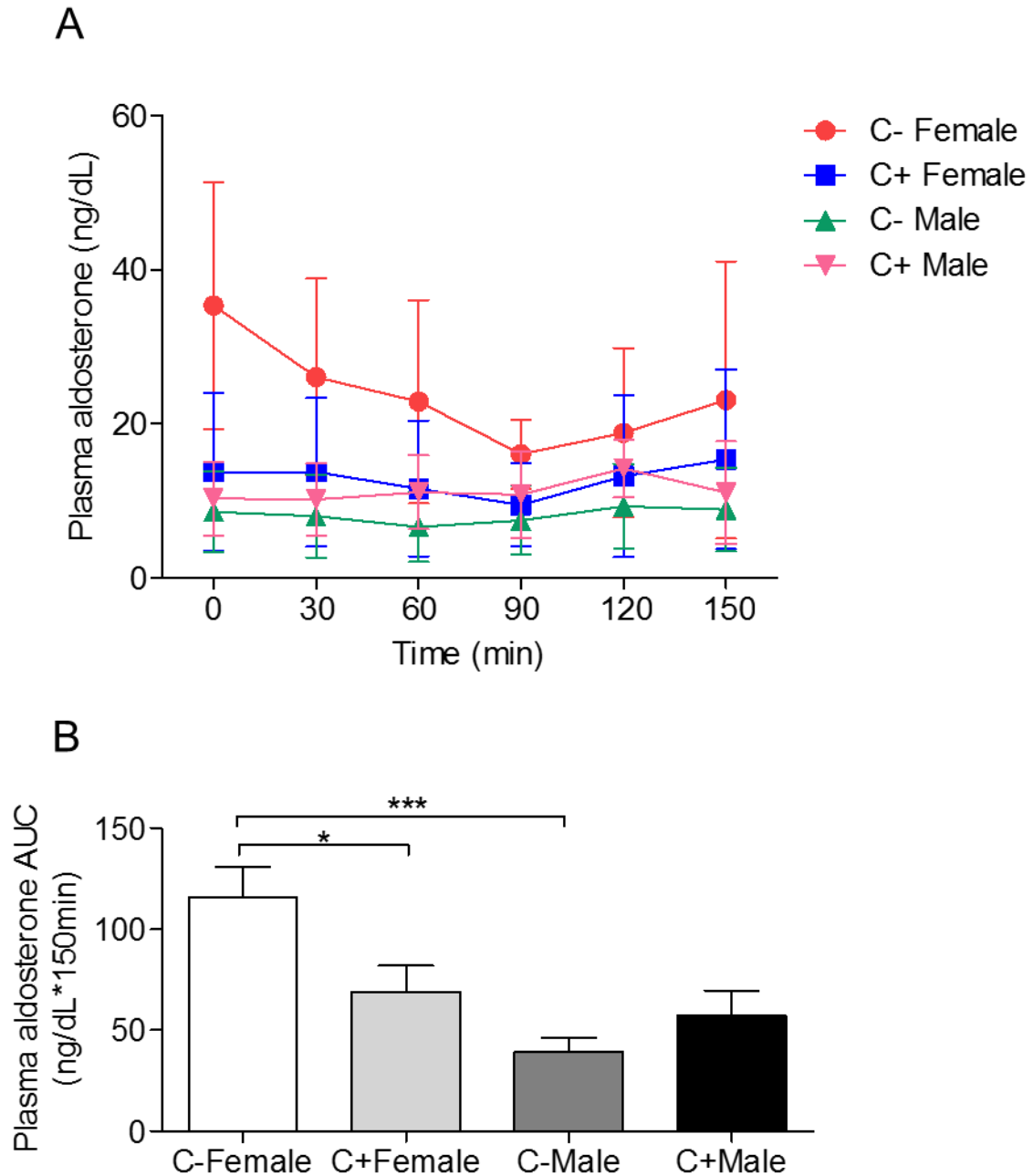


Figure 5: Analysis of the association of gender and polymorphic C allele in healthy subjects' postprandial plasma aldosterone. **A:** Time courses of plasma aldosterone according to gender and polymorphic C allele. **B:** Plasma aldosterone area under curve (AUC) in all time points (T0-T150). * $p < 0.5$ and *** $p < 0.001$; ANOVA with Tukey's post-test. All results are shown as mean \pm SD. The absence and the presence of the polymorphic C allele of *GIPR* are represented as C- and C+, respectively.

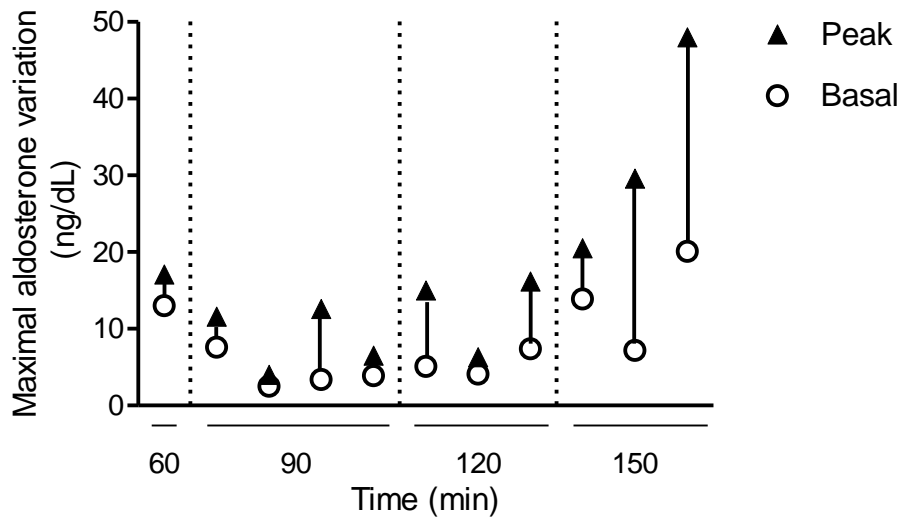


Figure 6: Representative maximal postprandial increases of plasma aldosterone from basal levels of 11 subjects who had renin-independent aldosterone responses. Basal=fasting period.

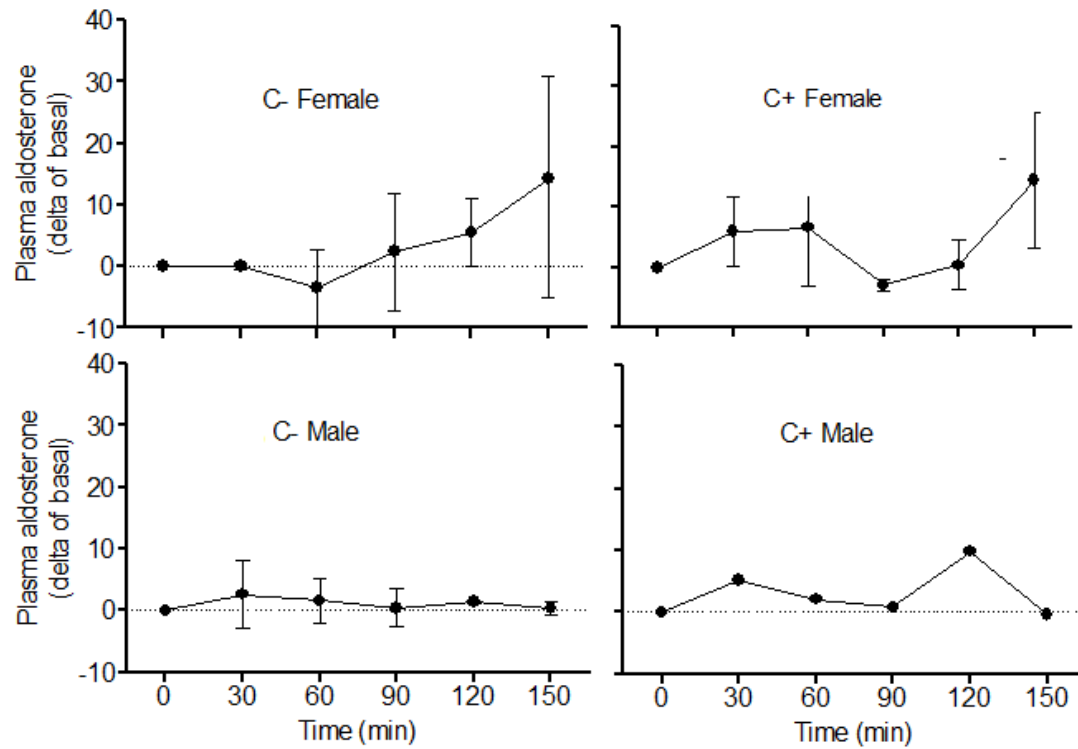


Figure 7: Time courses of postprandial aldosterone responses by gender and polymorphic C allele. Each graph represents the renin-independent aldosterone response every 30 minutes after the ingestion of a mixed meal. (C- Female: n=2; C+ Female: n=4; C- Male: n=4; C+ Male: n=1). All results are shown as mean \pm SD. The absence and the presence of the polymorphic C allele of *GIPR* are represented as C- and C+, respectively.

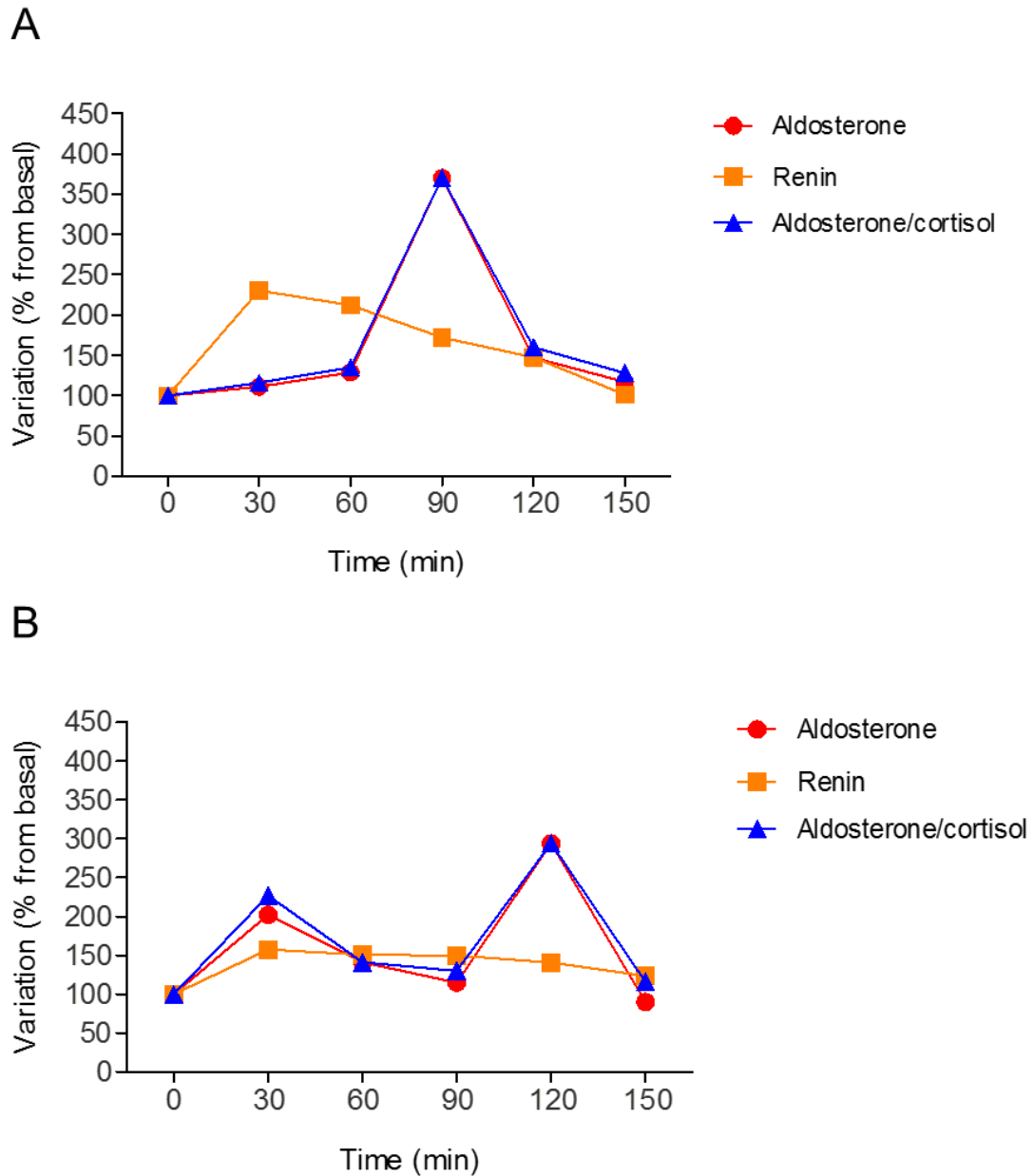


Figure 8: Time courses of postprandial aldosterone and renin basal levels from two polymorphism carriers who had renin independent aldosterone response. Plasma aldosterone was normalized by the aldosterone/cortisol ratio and ACTH was suppressed in all times. **A:** Female; genotype GC. **B:** Male; genotype GC.

References

DA SILVA MATTOS, A. L., NATASHA ; KOGA, GUSTAVO ; COSTA, SARAH ; AMARANTE, MARLA ; MAZZUCO, TÂNIA. GIPR rs1800437 polymorphism: prevalence and possible associations with metabolic syndrome-related diseases in a Brazilian urban population. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, p. A200, 2015.

FORTIN, J. P. et al. Pharmacological characterization of human incretin receptor missense variants. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 332, n. 1, p. 274-80, Jan 2010.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v. 264, n. 3, p. 224-36, Sep 2008.

JACOB, G. et al. Effect of standing on neurohumoral responses and plasma volume in healthy subjects. **J Appl Physiol (1985)**, v. 84, n. 3, p. 914-21, Mar 1998.

KATER, C. E. Hiperaldosteronismo Primário. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 46, n. 1, 2002.

LACROIX, A. et al. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 73, n. 1, p. 1-15, Jul 2010.

LACROIX, A. et al. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. **Endocr Rev**, v. 22, n. 1, p. 75-110, Feb 2001.

LAMPRON, A. et al. Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for glucose-dependent insulinotropic peptide in a patient with an aldosteronoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 3, p. 750-6, Mar 2009.

MAZZUCO, T. L. et al. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 782-90, Feb 2006.

MAZZUCO, T. L. et al. Aberrant hormone receptors in primary aldosteronism. **Horm Metab Res**, v. 42, n. 6, p. 416-23, Jun 2010.

N'DIAYE, N. et al. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 8, p. 2781-5, Aug 1998.

NOWACZYNSKI, W. et al. The relationship of plasma aldosterone-binding globulin to blood pressure regulation in young adults with cystic fibrosis. **Clin Physiol Biochem**, v. 5, n. 5, p. 276-86, 1987.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 480-3, Jan 2000.

SAUBER, J. et al. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. **Eur J Endocrinol**, v. 163, n. 2, p. 259-64, Aug 2010.

SAXENA, R. et al. Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. **Nat Genet**, v. 42, n. 2, p. 142-8, Feb 2010.

SPAT, A.; HUNYADY, L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. **Physiol Rev**, v. 84, n. 2, p. 489-539, Apr 2004.

SZMUILOWICZ, E. D. et al. Relationship between aldosterone and progesterone in the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 10, p. 3981-7, Oct 2006.

VOGEL, C. I. et al. Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups. **BMC Med Genet**, v. 10, p. 19, Mar 02 2009.

ZWERMANN, O. et al. Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. **Eur J Endocrinol**, v. 160, n. 3, p. 443-51, Mar 2009.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de curvas hormonais possuem um alto custo e são habitualmente realizados com números amostrais pequenos. Mesmo assim, foi possível identificar padrões de resposta muito interessantes. Este foi o primeiro estudo que se propôs a analisar em detalhe a variação da aldosteronemia pós-prandial, demonstrando que um número considerável de indivíduos saudáveis apresenta elevação da aldosterona em relação ao jejum.

Considerando que neste estudo a resposta de aldosterona pós-prandial foi independente dos moduladores do eixo hipotálamo-hipófise e do sistema renina-angiotensina, nós sugerimos que o GIP pode ser considerado um regulador da secreção de aldosterona. Estudos com amostras maiores poderiam nos ajudar a compreender melhor os padrões de resposta adrenal, e associá-los definitivamente com os gêneros ou com a alteração de função do receptor, conferida pela variante do gene *GIPR*, com aplicação direta na prática laboratorial de análises clínicas.

Mulheres que não possuem o alelo polimórfico rs1800437 do gene *GIPR* apresentam maiores concentrações de aldosterona total plasmática, tanto em jejum quanto em período pós-prandial, sendo assim, ressaltamos a importância de se estabelecer valores de referência de aldosterona diferenciados para homens e mulheres.

Uma perspectiva futura seria estudar os casos de aldosteronismo primário e verificar as respostas pós-alimentares e a presença do polimorfismo estudado. Outro possível processo de estudo seria selecionar a maior quantidade possível de mulheres que possuem ou não o polimorfismo do *GIPR* ou estudar outros polimorfismos ou mutações que interfiram no efeito do polimorfismo rs1800437.

A identificação de alterações moleculares pode levar ao desenvolvimento de técnicas farmacológicas voltadas para o controle da hiperprodução hormonal e, assim, auxiliar no manejo e tratamento de doenças como o aldosteronismo primário.

6 REFERÊNCIAS

ANTONINI, S. R. et al. Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 91, n. 3, p. 171-7, Jul 2004.

BECK, B. Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions. **J Mol Endocrinol**, v. 2, n. 3, p. 169-74, May 1989.

BOOTH, R. E. J., J. P.; STOCKAND, J. D. . Aldosterone. **Advances in Physiology Education**, v. 26, n. 1, p. 8-20, 2002.

CECCARELLI, E. et al. Beyond glycemic control in diabetes mellitus: effects of incretin-based therapies on bone metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 73, 2013.

CHADWICK, J. A. et al. Mineralocorticoid receptors are present in skeletal muscle and represent a potential therapeutic target. **FASEB J**, v. 29, n. 11, p. 4544-54, Nov 2015.

COSTA, M. H. et al. Analysis of glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) and luteinizing hormone receptor (LHCGR) expression in human adrenocortical hyperplasia. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 3, p. 326-31, Apr 2009.

FEHMANN, H. C.; GOKE, R.; GOKE, B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. **Endocr Rev**, v. 16, n. 3, p. 390-410, Jun 1995.

FIGUEIREDO, C. P. et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor expression in the hippocampus and neocortex of mesial temporal lobe epilepsy patients and rats undergoing pilocarpine induced status epilepticus. **Peptides**, v. 32, n. 4, p. 781-9, Apr 2011.

FORTIN, J. P. et al. Pharmacological characterization of human incretin receptor missense variants. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 332, n. 1, p. 274-80, Jan 2010.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v. 264, n. 3, p. 224-36, Sep 2008.

GAUDIN-AUDRAIN, C. et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor deficiency leads to modifications of trabecular bone volume and quality in mice. **Bone**, v. 53, n. 1, p. 221-30, Mar 2013.

GREMLICH, S. et al. Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. **Diabetes**, v. 44, n. 10, p. 1202-8, Oct 1995.

HANSEN, K. B. et al. Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 2, p. 447-53, Feb 2011.

HANSOTIA, T.; DRUCKER, D. J. GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. **Regul Pept**, v. 128, n. 2, p. 125-34, Jun 15 2005.

HANSOTIA, T. et al. Extrapancreatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 143-52, Jan 2007.

KATER, C. E. Hiperaldosteronismo Primário. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 46, n. 1, 2002.

KIM, S. J.; NIAN, C.; MCINTOSH, C. H. Resistin is a key mediator of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of lipoprotein lipase (LPL) activity in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 282, n. 47, p. 34139-47, Nov 23 2007.

LACROIX, A. et al. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. **Trends Endocrinol Metab**, v. 15, n. 8, p. 375-82, Oct 2004.

LACROIX, A. et al. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 73, n. 1, p. 1-15, Jul 2010.

LACROIX, A. et al. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. **Endocr Rev**, v. 22, n. 1, p. 75-110, Feb 2001.

LAMPRON, A. et al. Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal

hyperplasias reveals novel targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 9, p. 3611-8, Sep 2006.

LAMPRON, A. et al. Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for glucose-dependent insulinotropic peptide in a patient with an aldosteronoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 3, p. 750-6, Mar 2009.

LARAGH, J. H.; SEALEY, J. E. The plasma renin test reveals the contribution of body sodium-volume content (V) and renin-angiotensin (R) vasoconstriction to long-term blood pressure. **Am J Hypertens**, v. 24, n. 11, p. 1164-80, Nov 2011.

LEHNHARDT, A.; KEMPER, M. J. Pathogenesis, diagnosis and management of hyperkalemia. **Pediatr Nephrol**, v. 26, n. 3, p. 377-84, Mar 2011.

LOTHER, A. et al. Mineralocorticoids in the heart and vasculature: new insights for old hormones. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 55, p. 289-312, 2015.

LUFT, F. C.; WEINBERGER, M. H. Heterogeneous responses to changes in dietary salt intake: the salt-sensitivity paradigm. **Am J Clin Nutr**, v. 65, n. 2 Suppl, p. 612S-617S, Feb 1997.

MAZZUCO, T. L. et al. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 782-90, Feb 2006.

MAZZUCO, T. L. et al. Aberrant hormone receptors in primary aldosteronism. **Horm Metab Res**, v. 42, n. 6, p. 416-23, Jun 2010.

MAZZUCO, T. L.; HERRERA, A. C. S. A.; FONSECA, E. A. I. Interesse do Estudo dos Tumores Adrenocorticais em Patologia Experimental e Clínica. In: WATANABE, M. A. E.; ONO, M. A., et al (Ed.). **Tópicos em Patologia Experimental**. Londrina (PR), Brasil: EDUEL - Universidade Estadual de Londrina, v.1, 2008. cap. 11, p.177-200.

MIYAWAKI, K. et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. **Nat Med**, v. 8, n. 7, p. 738-42, Jul 2002.

MUNOZ-DURANGO, N. et al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 7, Jun 23 2016.

N'DIAYE, N. et al. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 8, p. 2781-5, Aug 1998.

NEHME, A. et al. Atlas of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in human: A transcriptomic meta-analysis. **Sci Rep**, v. 5, p. 10035, May 20 2015.

PEARCE, D. The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. **Trends Endocrinol Metab**, v. 12, n. 8, p. 341-7, Oct 2001.

SAUBER, J. et al. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. **Eur J Endocrinol**, v. 163, n. 2, p. 259-64, Aug 2010.

USDIN, T. B. et al. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 2861-70, Dec 1993.

VOGEL, C. I. et al. Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups. **BMC Med Genet**, v. 10, p. 19, Mar 02 2009.

WILLIAMS, G. H. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. **Heart Fail Rev**, v. 10, n. 1, p. 7-13, Jan 2005.

YAMADA, Y. et al. Human gastric inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. **Genomics**, v. 29, n. 3, p. 773-6, Oct 10 1995.

YIP, R. G. et al. Functional GIP receptors are present on adipocytes. **Endocrinology**, v. 139, n. 9, p. 4004-7, Sep 1998.

ZWERMANN, O. et al. Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. **Eur J Endocrinol**, v. 160, n. 3, p. 443-51, Mar 2009.