

EFEITOS DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE O METABOLISMO  
ENERGÉTICO E ESTRESSE OXIDATIVO NO MIOCÁRDIO DE RATOS  
PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA SECUNDÁRIA À ESTENOSE  
AÓRTICA

Fábio Rodrigues Ferreira Seiva; Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do hormônio de crescimento (GH) sobre o estresse oxidativo, metabolismo energético e sobre a fibrose miocárdica em ratos submetidos experimentalmente a insuficiência cardíaca. Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos: controle recebendo salina (C-P) e controle recebendo GH (C-GH), estenose aórtica mais salina (EA-P) e estenose aórtica recebendo GH (EA-GH). A dose de GH utilizada foi de 1 mg/kg durante 14 dias.

Os animais tratados com GH tiveram aumentados os níveis de IGF-I. Os dois grupos com EA tiveram a relação Peso do Coração/Peso Corporal maior quando comparados com os respectivos controles. O índice de fibrose miocárdica foi maior no grupo EA-P comparado aos grupos C e diminuiu no grupo EA tratado com o GH. Ambos os grupos tratados com GH tiveram elevada atividade da enzima lactato desidrogenase. O grupo EA-GH apresentou elevação da enzima marcadora do metabolismo de ácidos graxos (OHADH); já a enzima citrato sintase foi significativamente maior no grupo C-GH em relação aos grupos C-P e EA-GH. Os níveis de hidroperóxido de lipídio diminuíram nos animais do grupo EA-GH. Não houve alteração da enzima catalase nos quatro grupos estudados. A atividade da superóxido dismutase esteve maior nos grupos com EA. A principal via alterada pelo GH foi o sistema das glutations. O GH aumentou a atividade da GSH-Px no grupo com EA. O grupo EA-P teve aumentada a relação GSH-GSSG, indicando um aumento do estresse oxidativo neste grupo. Conclui-se que o GH alterou as vias metabólicas do coração aumentando a oxidação de ácidos graxos e elevando o metabolismo anaeróbico. O GH

também causou efeitos benéficos em relação ao estresse oxidativo, aumentando as defesas antioxidantes do coração, evitando os danos provocados pelos radicais livres.

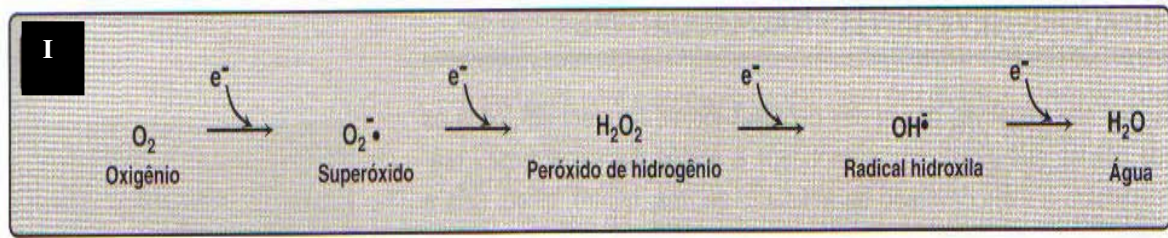
## INTRODUÇÃO

### - Coração, insuficiência cardíaca e estresse oxidativo.

O músculo cardíaco contém grande quantidade de mitocôndrias, possui elevada taxa de consumo de oxigênio e é caracterizado pela elevada capacidade oxidativa (BASS *et al.*, 1969). O coração pode obter energia a partir de vários substratos diferentes, como glicose, ácidos graxos, lactato, piruvato e corpos cetônicos (MALLET, 2000), dependendo das condições metabólicas do organismo. Preferencialmente, o miocárdio utiliza ácidos graxos como substrato para a produção de energia (HENNING *et al.*, 1996). A maior utilização de oxigênio pelo músculo cardíaco relaciona-se a maior quantidade de ATP (adenosina trifosfato) produzida pela oxidação de ácidos graxos em relação a carboidratos, bem como o fato que ácidos graxos ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ ), apresentam baixa concentração de oxigênio por molécula, em comparação com carboidratos ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). Deste modo, o músculo cardíaco necessita de cerca de 12% mais oxigênio, quando utiliza ácido graxo e não glicose como fonte de energia, para produzir a mesma quantidade de ATP (NELLY & MORGAN, 1974).

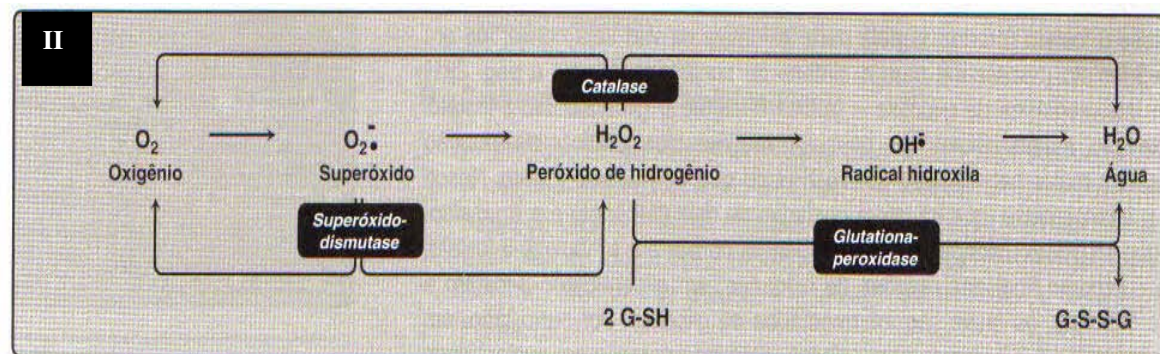
Nas últimas décadas muitos estudos têm destacado a importância de moléculas orgânicas produzidas a partir do metabolismo aeróbico, chamadas espécies reativas do oxigênio (EROs) ou radicais livres (RLs), moléculas altamente instáveis e reativas que possuem um elétron não-pareado no orbital mais externo (ELSBACH & WEISS, 1983). Essa configuração eletroquímica permite a interação entre moléculas podendo causar alterações nos componentes celulares: proteína, DNA e lipídio (BROWN-BORG *et al.*, 1999). A produção de EROs é uma consequência fisiológica do metabolismo aeróbico, uma vez que 95% do oxigênio é consumido na cadeia transportadora de elétrons (CTE) nas mitocôndrias, produzindo uma pequena, mas significativa, quantidade de EROs (CHANCE *et al.*, 1979; CLARK, 2002). A redução incompleta do  $\text{O}_2$  até a  $\text{H}_2\text{O}$  leva à

formação de intermediários metabólicos instáveis e reativos, a saber: radical (ânion) superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) (Esquema I).



Esquema I: Redução tetraivalente do oxigênio e formação de intermediários reativos.

Os organismos aeróbicos possuem mecanismos de defesa endógenos contra a ação tóxica da EROs, divididos basicamente em dois grupos: as enzimas de atividade antioxidante (Esquema II) e os antioxidantes não-enzimáticos (BROWN-BORG *et al.*, 1999). Os primeiros correspondem principalmente às enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (MALLET, 2003).



Esquema II: Sistema de defesa antioxidante

Os agentes antioxidantes não-enzimáticos compreendem as substâncias antioxidantes totais (SAT), incluindo as vitaminas C e E ( $\alpha$ -tocoferol) e peptídeos ativos representados pela glutathiona reduzida (GSH) (FERRARI *et al.*, 1998).

O estresse oxidativo (EO) é o desequilíbrio entre as substâncias antioxidantes e pró-oxidantes (HALLIWELL *et al.*, 1999) e está relacionado com inúmeros processos, tanto fisiológicos, como o envelhecimento, como processos patológicos, como a insuficiência cardíaca (IC).

IC é caracterizada como uma síndrome complexa na qual mudanças fisiopatológicas e bioquímicas ocorrem como consequência da disfunção ventricular esquerda (CICOIRA *et al.*, 2003), sendo essa a etapa final resultante de vários tipos de cardiopatia, na qual o coração é incapaz de bombear sangue suficiente para as necessidades metabólicas do organismo. É uma condição grave que, apesar dos avanços na área cardiovascular, continua sendo uma das principais causas de hospitalização, morbidade e mortalidade nas populações atuais (HO *et al.*, 1993; PICHARDO *et al.*, 1999). Embora usualmente atribuída ao dano coronariano obstrutivo, a disfunção miocárdica tem sido observada em inúmeras condições, mesmo na ausência de aterosclerose (LEFER *et al.*, 2000), o que demonstra a participação de outros fatores para o início e/ou progressão da IC.

O EO pode prejudicar funções e estruturas essenciais do coração como as membranas miocárdicas (COETZEE *et al.*, 1993), metabolismo do cálcio (KANEKO *et al.*, 1994) e o metabolismo energético (CARVAJAL, 2003). Segundo SINGAL e KIRSHENBAUM (1990) o aumento na produção de EROs leva a uma resposta adaptativa cardíaca, com o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e estabilizando as funções cardíacas, dessa forma protegendo o coração neste estágio inicial. Entretanto, a continuação e/ou um aumento na produção de EROs leva a um déficit nas defesas antioxidantes favorecendo a transição entre o estágio compensado para uma função cardíaca prejudicada e conseqüente IC. Alguns estudos corroboram com essa hipótese sugerindo a participação das EROs no estágio de descompensação miocárdica na IC (GUPTA *et al.*, 1989). DHALLA *et al.* (1996), Keith *et al.* (1998) e Pichardo *et al.* (1999) demonstraram que na progressão do quadro de IC, alterações bioquímicas no metabolismo energético e, relacionadas ao estresse oxidativo miocárdico são fatores que influenciam alterações sistêmicas.

Em pacientes com IC foi encontrado um aumento significativo nos níveis de peróxido de lipídio e malondialdeído estando esses relacionados diretamente com a gravidade da IC (KEITH *et al.*, 1998). Dessa forma, qualquer tentativa para impedir,

diminuir ou mesmo retardar esses danos causados pelas EROs é de fundamental relevância.

#### **- GH, coração e insuficiência cardíaca**

A IC está também diretamente relacionada com o status hormonal do organismo. Desde a primeira observação feita por Huchard (1985) mostrando alterações cardíacas na acromegalia (condição com concentrações sanguíneas suprafisiológicas de hormônio de crescimento), a publicação de Rosen e Bengtsson em 1990, relatando uma maior mortalidade, por doenças vasculares, em pacientes com hipopituitarismo e deficiência de hormônio de crescimento (DGH), várias pesquisas foram feitas para se entender a função deste hormônio no sistema cardiovascular. Da mesma forma estudos recentes epidemiológicos apontam para uma associação entre o hipopituitarismo em adultos e um aumento na mortalidade por problemas cardiovasculares (BATES *et al.*, 1996), deixando claro assim, a importância do hormônio de crescimento não apenas para o desenvolvimento ósseo longitudinal (THORNER & VANCE, 1988).

O hormônio de crescimento (GH) ou somatotropina é um polipeptídio de 191 aminoácidos sintetizado e secretado pelas células da hipófise anterior (somatotrófos) e tem sua ação direta ou indiretamente mediada pelo IGF-I (fator de crescimento insulina-símile), produzido principalmente no fígado e que age como mediador de muitos feitos fisiológicos do GH nos tecidos periféricos (JONES *et al.*, 1995). Dados experimentais e clínicos mostram que tanto o excesso (gigantismo ou acromegalia) como a DGH podem afetar de maneiras diversas o coração. A DGH interfere em vários caminhos que podem aumentar os riscos para as cardiopatias (De BOER *et al.*, 1995) tais como: mudanças metabólicas (hiperlipidemia e aterosclerose prematura) e prejuízo na estrutura e função cardíacas (diminuição da massa ventricular e do débito cardíaco) (AMATO *et al.*, 1993; MEROLA *et al.*, 1993; SACCÀ *et al.*, 1997). Por outro lado a suplementação com GH aumentou a massa e função miocárdica (MAISON & CHANSON, 2003), bem como a capacidade de realização de exercícios nestes indivíduos (SACCÀ *et al.*, 1994).

O excesso de GH por sua vez também leva a alterações importantes no tecido cardíaco. No decorrer dos anos pacientes com acromegalia, não tratados, desenvolvem uma síndrome hiperkinética (aumento da contratilidade e do débito cardíacos), seguida de hipertrofia miocárdica (fibrose intersticial), disfunção diastólica e sistólica e por fim, IC (LOMBARDI *et al.*, 1997; SACCÀ *et al.*, 2003). Da mesma forma, modelos animais com excesso de IGF-I, apresentam inicialmente, hipertrofia miocárdica e aumento do débito cardíaco (TIMSIT *et al.*, 1990).

A importância do eixo GH / IGF-I também fica demonstrada em animais com excesso de IGF-I submetidos experimentalmente ao infarto do miocárdio. Estes apresentaram diminuição do processo de remodelamento e de disfunção ventricular esquerda (CITTADINI *et al.*, 2003). Em humanos, com infarto agudo do miocárdio, as concentrações de IGF-I correlacionaram-se positivamente com a sobrevida e função miocárdica dos pacientes (WEN-LIENG *et al.*, 1999). O eixo GH / IGF-I encontra-se alterado em portadores de IC (KONTOLEON *et al.*, 2003). Redução no IGF-I, decorrente da diminuição da secreção do GH ou da resistência à sua ação, foi descrita em indivíduos portadores de IC isquêmica ou em cardiomiopatias dilatadas (TIMSIT *et al.*, 1990; ANKER *et al.*, 2001; KONTOLEON *et al.*, 2003). A partir destes dados fica claramente demonstrado o importante papel do IGF-I sobre o coração, além disso, outros efeitos metabólicos (influência sobre o metabolismo da glicose, lipogênese, efeito anti-apoptótico, entre outros) também são atribuídos ao IGF-I (RANKE *et al.*, 2005).

Durante a evolução do processo de remodelação cardíaca também ocorre fibrose devido ao aumento da matriz extracelular, por deposição de colágeno e de fibronectina, que influencia a capacidade funcional do coração (KATO *et al.*, 1995; ZORNOFF *et al.*, 1997). EROs podem causar hipertrofia em miócitos cardíacos isolados e aumentar a atividade das metaloproteinases na matriz extracelular (SIWICK *et al.* 1999, 2001), corroborando com vários estudos que sugerem o equilíbrio redox celular como um determinante do processo pró-fibrótico (CAVE *et al.*, 2005). O GH também pode levar

a um aumento na fibrose miocárdica em condições como a acromegalia (CUOCOLO *et al.*, 1995; LIE *et al.*, 1980). A exposição a altas concentrações sanguíneas de GH provoca o aparecimento de comorbidades, como diabetes melito e hipertensão arterial sistêmica, as quais podem induzir fibrose cardíaca *per se* (GRIMM *et al.*, 1998). Em um estudo, entretanto, que observou ratos com IC pós-infarto do miocárdio, foi demonstrada significativa redução da fibrose e aumento da sobrevida após a administração de GH em uma fase inicial da lesão isquêmica (CITTADINI *et al.*, 2003), e esse efeito poderia estar associado com o EO.

Uma vez que a fibrose cardíaca está associada com um mau prognóstico encontrado nos portadores de IC e encontra-se associada a arritmias graves, disfunção diastólica e progressão da IC e, posteriormente, morte, sua prevenção ou reversão consistem em um importante alvo terapêutico (SACCÀ *et al.*, 2003).

#### **- GH e estresse oxidativo**

Até o presente, poucos trabalhos experimentais examinaram a fundo a influência do GH sobre a geração de EROs, “status” antioxidante e metabólico miocárdico na IC secundária à sobrecarga ventricular esquerda.

Pode-se, porém verificar que o perfil hormonal também está relacionado com o metabolismo energético e com a produção de EROs. Estudos mostram (BROWN-BORG *et al.*, 2002) que os hormônios modulam as defesas antioxidantes e, portanto, estados de hipo- ou hipersecreção hormonal podem influenciar o EO. As alterações nas enzimas antioxidantes em resposta aos hormônios parecem ser tecido-específica e dose-dependente (BROWN-BORG *et al.*, 2002).

Em modelos experimentais com ratos da linhagem dwarf (animais com DGH), a atividade da enzima catalase está aumentada, levando a uma maior proteção contra danos oxidativos (BROWN-BORG *et al.*, 1999). Por outro lado, a atividade de outras enzimas, como a glutathiona peroxidase, envolvida também na eliminação de peróxidos de hidrogênio (FLOHE *et al.* 1984), esta diminuída no coração desses animais.

Da mesma forma que a DGH altera a produção das EROs, a hipersecreção desse hormônio está associada com uma produção aumentada de RLs. Ratos que superexpressaram o GH tiveram níveis aumentados de radicais superóxido e peroxidação lipídica (ROLLO *et al.*, 1996). A produção excessiva deste hormônio, além de diminuir a atividade de algumas enzimas, como a catalase (BROWN-BORG *et al.*, 2003), também provoca diminuição na expectativa de vida (PENDERGRASS *et al.*, 1993). Além disso, essa redução também tem sido relatada em pacientes com acromegalia (JADRESIC *et al.*, 1982), podendo estar associada a um efeito do EO.

## **HIPÓTESE**

Tendo em vista a interrelação entre IC, GH e EROs, postulou-se a hipótese que os efeitos benéficos alcançados com o tratamento com GH, estão relacionados direta ou indiretamente com alterações no metabolismo energético cardíaco e/ou na relação oxidantes/antioxidantes.

## **OBJETIVO**

Tendo em vista a importância do estresse oxidativo e do hormônio de crescimento no aparecimento e evolução da insuficiência cardíaca (IC), o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o estresse oxidativo, fibrose e o metabolismo energético no tecido cardíaco de ratos portadores de insuficiência cardíaca secundária à estenose aórtica.
- Determinar o efeito da administração do hormônio de crescimento, sobre o metabolismo energético, estresse oxidativo e fibrose no tecido cardíaco de ratos portadores de insuficiência cardíaca secundária à estenose aórtica.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e protocolo experimental**

O protocolo experimental desse estudo foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal seguido pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Foi realizado estudo *in vivo* e controlado. Utilizou-se um modelo animal de cardiopatia hipertrófica, secundário à sobrecarga ventricular esquerda, induzido por estenose aórtica. Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, com peso inicial médio de  $95 \pm 5$ g, provenientes do Biotério Central da UNESP, Botucatu. Os animais foram transferidos para o “Laboratório de Experimentação Animal” da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, onde foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com ciclo de luminosidade de 12h. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com ração Purina Labina (Campinas, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos inicialmente em 2 grupos (n=12): o grupo (C) submetido à toracotomia, sem indução de estenose aórtica e o grupo (EA) submetido à estenose aórtica.

A partir de 19 semanas da indução da estenose aórtica os animais foram observados diariamente para a detecção de taquipnéia. Assim que detectada, os ratos foram submetidos ao ecocardiograma (ECO) para avaliação da função cardíaca. Ratos do grupo C foram submetidos ao ECO no mesmo período que os do grupo EA. Após avaliação da função cardíaca pelo ECO e sua classificação pela função discriminante de Fisher (MOREIRA *et al.*, 2006), os animais com EA classificados como insuficiência cardíaca grave, foram submetidos ou não ao tratamento com hormônio de crescimento, assim como os animais do grupo C, desta forma os animais foram divididos em 4 grupos:

|  |                                                                                           |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | <b>Grupo (C-P)</b> – controle-placebo, recebendo solução salina 0,9%, pela via subcutânea |  |
|  | (sc);                                                                                     |  |
|  | <b>Grupo (C-GH)</b> – controle, recebendo 1mg/Kg/dia de hrGH, sc.                         |  |
|  | <b>Grupo (EA-P)</b> – submetidos à IC secundária à estenose aórtica, recebendo solução    |  |
|  | salina 0,9%,sc.                                                                           |  |
|  | <b>Grupo (EA-GH)</b> – submetidos à IC secundária à estenose aórtica, recebendo           |  |
|  | 1 mg/Kg/dia de hrGH, sc.                                                                  |  |

Foi administrado o GH humano, à semelhança de outros estudos experimentais em ratos e nos quais se verificou efeitos cardíacos benéficos do hormônio (CITTADINI *et al.*, 1996; RYOKE *et al.*, 1999; TIVESTEN *et al.*, 2001). Foi selecionada a dose de 1 mg/kg/dia, administrado por via subcutânea. Esta dose não provocou aparecimento de fibrose ou de efeitos hemodinâmicos indesejáveis, em ratos normais ou infartados, e ainda obteve-se efeitos benéficos segundo os estudos avaliados (ISGAARD *et al.*, 1997; GRIMM *et al.*, 1998; GROESBECK *et al.*, 1987; YANG *et al.*, 1993). Selecionou-se o tempo de tratamento de duas semanas, devido ao potencial risco de desenvolvimento de anticorpos ao se administrar o GH humano, em animais, por mais de 3 semanas (GROESBECK *et al.*, 1987).

### **Indução da cardiomiopatia hipertrófica por estenose aórtica cirúrgica**

Para a indução da estenose aórtica, os animais foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi

colocado a aproximadamente três mm de sua raiz. Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual à pressão positiva (CARVALHO *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2006).

### **Critério para seleção dos animais**

A partir de 19 semanas da indução da estenose aórtica os animais foram observados diariamente para a detecção de sinais de disfunção ventricular, como taquipnéia. Assim que detectada, os ratos foram submetidos ao ecocardiograma. Os resultados ecocardiográficos foram utilizados para o cálculo da função discriminante e classificação da função cardíaca, segundo Moreira *et al.*, (2006). Dentre os animais com EA, foram selecionados os que apresentavam disfunção cardíaca grave para indicarmos, aleatoriamente, o tratamento com GH ou não. Os animais que, inicialmente, não se enquadraram nessa classificação foram submetidos à realização de novo(s) ecocardiograma (s).

### **Avaliação ecocardiográfica**

A avaliação ecocardiográfica foi feita antes e depois do tratamento, pelo mesmo observador, que desconhecia qual tratamento (GH ou não) foi administrado aos animais. Os exames ecocardiográficos foram realizados no hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu (Departamento de Clínica Médica), UNESP, Botucatu, SP.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg), administrado por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o exame foi realizado com o equipamento modelo Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co., equipado com transdutor eletrônico de 7,5 MHz. As medidas estruturais do coração foram obtidas segundo Moreira *et al.*, (2006). Na tabela I estão as variáveis ecocardiográficas utilizadas para a classificação do grau de disfunção cardíaca.

**Tabela 1** – Média  $\pm$  desvio padrão (DP) das variáveis ecocardiográficas mais discriminantes dos grupos obtidos a partir da análise de agrupamento.

| GRUPOS       |                    |                          |                          |
|--------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
|              | Controle<br>(n=12) | Disfunção Leve<br>(n=13) | Disfunção Grave<br>(n=9) |
| Variável     | Média $\pm$ DP     | Média $\pm$ DP           | Média $\pm$ DP           |
| AE/PC        | 10,82 $\pm$ 1,51   | 14,80 $\pm$ 3,02         | 18,07 $\pm$ 2,66         |
| Índice MVE   | 1,89 $\pm$ 0,28    | 2,77 $\pm$ 0,54          | 3,69 $\pm$ 0,74          |
| VEPP         | 45,63 $\pm$ 6,67   | 45,26 $\pm$ 4,42         | 32,85 $\pm$ 4,11         |
| % Enc. Endo. | 51,97 $\pm$ 4,48   | 69,24 $\pm$ 6,70         | 50,54 $\pm$ 5,40         |
| % Enc. Mio.  | 30,98 $\pm$ 2,88   | 39,70 $\pm$ 3,49         | 27,65 $\pm$ 3,20         |

AE: diâmetro do átrio esquerdo (mm); PC: peso corporal (kg); índice MVE: massa do VE/PC (g/kg); VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; %Enc. Endo: porcentagem de encurtamento Endocárdico do Ventrículo Esquerdo; %Enc.Mio: porcentagem de encurtamento da região central das paredes do VE.

### Eutanásia e obtenção da amostras

Após o segundo ecocardiograma, realizado após 14 dias de tratamento com GH, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, sob anestesia (injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p).

O coração foi imediatamente pesado e dissecado. Os músculos papilares foram retirados cuidadosamente do ventrículo esquerdo e imersos em formol para o estudo histológico. Aproximadamente 200 mg de ventrículo esquerdo (VE) foram armazenados em freezer -86°C, para posterior investigação bioquímica. Também foi coletada amostra de sangue para avaliação hormonal dos animais.

### Avaliação hormonal

Com o objetivo de avaliar o efeito hormonal do GH, foram dosadas as concentrações séricas de IGF-1, coletadas após 12 horas da última injeção com GH, nos grupos experimentais. As dosagens foram feitas no mesmo ensaio, em duplicata,

empregando-se a metodologia de RIA (Kit comercial Mouse/rat IGF-1 RIA Referência: DSL 2900 – Diagnostic Systems Laboratories Inc.).

## **Avaliação de fibrose**

### **Processamento Histológico**

Após a retirada do músculo papilar, estes foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h. Após este período, esse material foi colocado em cassetes plásticos identificados com os nomes dos respectivos grupos experimentais e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

### **Imunoistoquímica**

Cortes histológicos de músculo papilar de 4 µm de espessura foram obtidos e corados com a técnica de coloração picrosirius-red para quantificação da fibrose (BRÜEL & OXLUND, 1999). Foram selecionados quatro campos para cada amostra de músculo papilar, com a objetiva de 100X. Foram desprezados campos com fibras transversais, com cordoalhas tendíneas e porções de tecido que enrugaram no momento de fixação do tecido na lâmina. Utilizou-se o programa Leica QWin V3, que calcula a fibrose em porcentagem: Índice de Fibrose (IF) = área de tecido colágeno em relação à área de tecido colágeno mais área de miócito X 100.

A leitura das lâminas foi realizada sem conhecimento quanto ao grupo de tratamento, em triplicata, por diferentes pesquisadores.

## **Avaliação bioquímica**

As amostras do VE foram descongeladas e homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais (LOWRY *et al.*, 1951), análise do estresse oxidativo e de enzimas marcadoras das vias

metabólicas. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (μQuant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma (St. Louis, MO, USA).

A concentração de glutathiona oxidada (GSSG) foi determinada com 2 mM de ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) (DTNB) em 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Glutathiona reduzida (GSH) foi determinada através de método cinético em um meio de reação contendo 0.6mM DTNB, 0.2 mM NADPH e 2U de glutathiona redutase em 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /5 mM EDTA. A atividade da enzima GSH-Px (E.C. 1.11.1.9) foi determinada através da oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio e cumene hidroperóxido (NAKAMURA *et al.*, 1974). A enzima glutathiona redutase (GSH-Rd, E.C.1.6.4.2.) foi determinada através da oxidação de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida) a 340 nm (MILLER & BLAKELY, 1992). O meio utilizado continha 1mM tampão Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 33 mM GSSG e 2 mM NADPH. A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada através da alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e fenazina metassulfato em pH fisiológico (EWING & JANERO, 1995). A atividade enzimática da catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 12,5 μL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm. (AEBI *et al.*, 1974).

As SAT foram determinadas através da capacidade de antioxidantes inibirem a oxidação de ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazilcolina-sulfônico) (ABTS, Sigma) (RICE EVANS & MILLER, 1994; MEHMETÇIK *et al.*, 1997). A concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) foi determinada através da oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato ferroso amoniacal). O  $\text{Fe}^{3+}$  formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido. Leituras foram realizadas a 560nm (JIANG *et al.*, 1991).

O metabolismo energético cardíaco foi determinado através das atividades das enzimas lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27),  $\beta$ -hidroxiacil coenzima A desidrogenase (OHADH, E.C. 1.1.1.35) e da citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) (BASS *et al.*, 1969). A atividade da LDH foi determinada pela oxidação do NADH a 340nm, tendo o piruvato como substrato (BASS *et al.*, 1969). A atividade da OHADH foi determinada no coração em meio contendo acetoacetil coenzima A 0,05 mM e NADH 0,1 mM (BASS *et al.*, 1969). A atividade da CS foi determinada em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo acetil CoA 0,1 mM, dithiobis-2-nitrobenzoato 0,1 mM (DTNB-Sigma) e oxaloacetato 0,5 mM (BASS *et al.*, 1969).

### **Análise estatística**

Foi realizada no Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, SP. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA), para dois fatores, para experimentos inteiramente casualizados, complementada com o teste de Tuckey pos hoc. Foi considerado o nível de significância de 5% (SNEDECOR e COCHRAN, 1980).

### **Resultados**

Os animais no início do experimento apresentavam pesos semelhantes nos quatro grupos. Pode se observar na Tabela II que estenose aórtica e tratamento com GH isolados não induziram alterações significantes no peso corporal (PC) final. Entretanto, o grupo com estenose e que recebeu tratamento com GH apresentou PC diminuído comparado com o grupo C-GH ( $p < 0,05$ ). Houve elevação no peso do coração (PCo) e na relação PCo/PC no grupo EA-P comparado ao C-P ( $p < 0,001$ ) e no grupo EA-GH comparado ao C-GH ( $p < 0,001$ ) (Figura 1).

**Tabela II** – Peso corporal final (PC), peso do coração (PCo), relação PCo / PC, concentração de proteína solúvel, concentração de IGF-I e índice de fibrose no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH)

| Variáveis / Grupos              | C - P          | C - GH                       | EA - P                      | EA - GH                      |
|---------------------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>PC</i><br>(g)                | 525,86 ± 61,40 | 564,04 ± 41,46               | 477,63 ± 66,17              | 510,90 ± 33,39 <sup>b</sup>  |
| <i>PCo</i><br>(g)               | 1,28 ± 0,10    | 1,39 ± 0,15                  | 2,35 ± 0,31 <sup>a</sup>    | 2,57 ± 0,25 <sup>b</sup>     |
| <i>PCo / PC</i><br>(g / kg)     | 2,47 ± 0,23    | 2,47 ± 0,18                  | 5,02 ± 1,10 <sup>a</sup>    | 5,05 ± 0,60 <sup>b</sup>     |
| <i>Proteína</i><br>(%)          | 20,2 ± 1,12    | 19,1 ± 1,18                  | 18,2 ± 1,04 <sup>a</sup>    | 16,8 ± 1,29 <sup>bc</sup>    |
| <i>IGF-I</i><br>(ng / ml)       | 1852,39±226,86 | 2116,16 ±226,48 <sup>a</sup> | 837,12 ±211,27 <sup>a</sup> | 2108,10 ±689,15 <sup>c</sup> |
| <i>Índice de Fibrose</i><br>(%) | 1,88 ± 0,88    | 1,91 ± 0,74                  | 10,34 ± 1,29 <sup>a</sup>   | 4,44 ± 1,37 <sup>b c</sup>   |

Valores expressos em Média ± DP; p < 0,05.

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH

(c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

A concentração de proteína total (PT) foi reduzida nos animais do grupo EA-P em relação ao C-P (p < 0, 001) e no grupo EA-GH em relação ao grupo EA-P (p < 0,05).

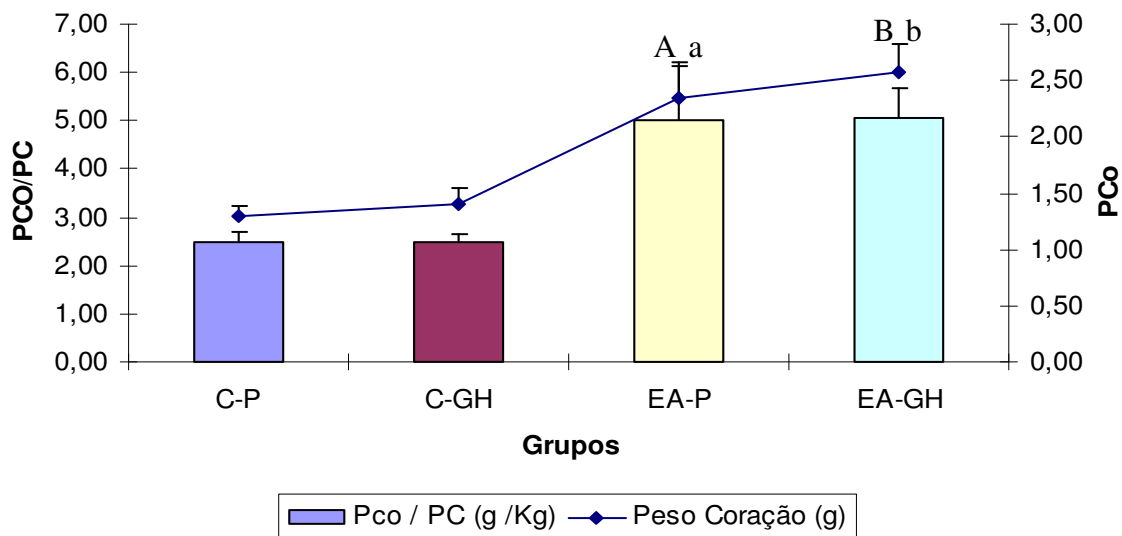


Figura 1 – Relação Peso Coração (g) / Peso Corporal (kg) (PCo / PC) pelo PCo (g) de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH). Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras maiúsculas representam diferenças entre barras e letras minúsculas diferença entre linhas.

(A, a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(B, b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH

As concentrações de IGF-I foram maiores nos animais tratados com GH comparado com seus respectivos controles (Figura 2). O grupo EA-P apresentou menor concentração de IGF-I comparado com o grupo C-P ( $p < 0,001$ ). Houve aumento no índice de fibrose no grupo EA-P comparado com o grupo C-P ( $p < 0,001$ ) e o tratamento com GH reduziu esse índice no grupo EA-GH comparado ao grupo EA-P ( $p < 0,001$ ) (Figura 3).

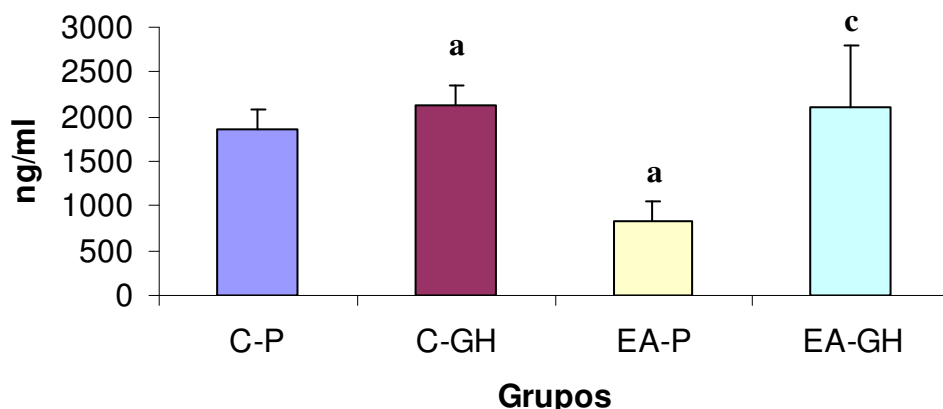


Figura 2 – Concentração de IGF-I circulante no soro de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH).

Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras minúsculas representam diferença entre barras.

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

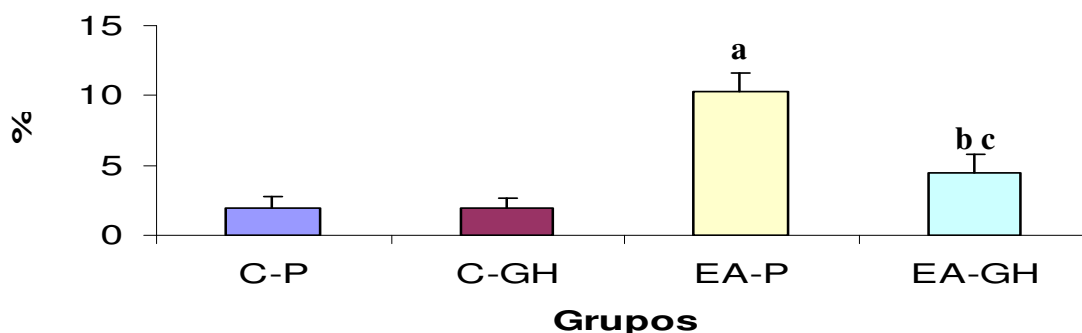


Figura 3 – Índice de fibrose (%) no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH). Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras minúsculas representam diferença entre barras.

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH

(c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

A Tabela III mostra que a atividade da enzima OHADH foi mais elevada apenas no grupo EA-GH comparado com seu controle ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com GH apresentaram elevação na atividade da enzima LDH

comparado com os controles que não receberam tratamento. Já a atividade da enzima citrato sintase esteve aumentada no grupo C-GH, comparada aos grupos C-P ( $p < 0,005$ ) e EA-GH ( $p < 0,05$ ). A relação LDH/CS foi maior no grupo C-GH comparando com seu grupo controle ( $p < 0,001$ ) e a relação OHADH/CS esteve aumentada no grupo EA-GH comparada com os grupos C-GH ( $p < 0,05$ ) e EA-P ( $p < 0,05$ ).

**Tabela III** – Atividades das enzimas hidróxi-acil coenzima A desidrogenase (OHADH), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e as relações LDH /CS e OHADH / CS no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH)

| Variáveis / Grupos                   | C - P          | C - GH                      | EA - P         | EA - GH                      |
|--------------------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|------------------------------|
| <b>OHADH</b><br>(nmol / mg proteína) | 202,88 ± 23,66 | 231,76 ± 40,25              | 220,39 ± 42,15 | 372,05 ± 147,58 <sup>c</sup> |
| <b>LDH</b><br>(nmol / mg proteína)   | 68,42 ± 21,11  | 119,33 ± 21,28 <sup>a</sup> | 75,30 ± 26,03  | 105,69 ± 27,56 <sup>c</sup>  |
| <b>CS</b><br>(nmol / mg proteína)    | 167,32 ± 33,32 | 225,53 ± 37,86 <sup>a</sup> | 146,78 ± 47,33 | 165,58 ± 39,56 <sup>b</sup>  |
| <b>LDH / CS</b>                      | 0,41 ± 0,11    | 0,53 ± 0,06 <sup>a</sup>    | 0,56 ± 0,24    | 0,65 ± 0,16                  |
| <b>OHADH / CS</b>                    | 1,18 ± 0,25    | 1,02 ± 0,06                 | 1,47 ± 0,52    | 2,27 ± 0,82 <sup>bc</sup>    |

Valores expressos em Média ± DP;  $p < 0,05$ .

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH

(c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

Na Tabela IV estão representadas as atividades das enzimas antioxidantes e as concentrações de hidróperóxido de lipídio (HP) e substâncias

antioxidantes totais (SAT). Não foram observadas diferenças significantes nas concentrações de SAT e na relação HP / SAT nos grupos estudados, entretanto a concentração de HP foi menor no grupo EA-GH comparado com o grupo EA-P ( $p < 0,001$ ). A atividade da enzima catalase não foi diferente entre os grupos estudados. Já as atividades da SOD e GSH-Px, quando comparados os grupos EA-P e EA-GH foram mais elevadas no grupo tratado com GH ( $p < 0,05$  e  $p < 0,005$ , respectivamente), e mais elevadas também em relação ao grupo C-GH ( $p < 0,05$ ). A atividade da enzima SOD esteve aumentada no grupo EA-P comparado com o C-P ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4). A atividade da GSH-Rd foi menor no grupo EA-GH comparado com C-GH ( $p < 0,005$ ) e EA-P ( $p < 0,05$ ). As relações das enzimas antioxidantes catalase / HP, SOD / HP e GSH-Px / HP são mostradas na Figura 5. Apenas o grupo EA-GH, comparado com o grupo EA-P, apresentou elevação nestas relações.

O sistema glutathiona está representado nas Figuras 6 e 7. A concentração de glutathiona oxidada (GSSG) esteve mais elevada nos grupos C-GH ( $p < 0,05$ ) e EA-P ( $p < 0,05$ ), comparados ao grupo C-P e diminuiu no grupo EA-GH comparado ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ ). A concentração da glutathiona reduzida (GSH) foi menor nos grupos com estenose, comparados aos seus respectivos controles. Já a relação GSH / GSSG foi menor apenas nos grupos C-GH e EA-P comparados ao grupo C-P ( $p < 0,005$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

**Tabela IV** – Concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), relação HP / SAT, atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona redutase (GSH-Rd) e concentrações de glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona reduzida (GSH), relação GSH / GSSG e relação catalase / HP, SOD / HP e GSH-Px / HP CS no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH)

| Variáveis / Grupos                      | C - P           | C - GH                    | EA - P                    | EA - GH                      |
|-----------------------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>HP<br/>(nmol / mg tecido)</i>        | 193,77 ± 54,73  | 162,49 ± 103,19           | 169,47 ± 44,19            | 99,08 ± 45,23 <sup>c</sup>   |
| <i>SAT (%)</i>                          | 31,24 ± 5,66    | 37,17 ± 16,59             | 30,30 ± 6,16              | 34,56 ± 9,15                 |
| <i>HP / SAT</i>                         | 6,33 ± 1,86     | 6,06 ± 5,12               | 6,05 ± 2,85               | 3,30 ± 2,26                  |
| <i>Catalase<br/>(nmol/ mg proteína)</i> | 1,23 ± 0,13     | 1,32 ± 0,18               | 1,27 ± 0,15               | 1,47 ± 0,27                  |
| <i>SOD<br/>(nmol/ mg proteína)</i>      | 7,34 ± 0,57     | 7,67 ± 0,55               | 8,36 ± 1,36 <sup>a</sup>  | 10,02 ± 1,70 <sup>bc</sup>   |
| <i>GSH-Px<br/>(nmol/ mg proteína)</i>   | 47,70 ± 17,58   | 39,70 ± 16,62             | 35,40 ± 17,20             | 60,93 ± 5,21 <sup>bc</sup>   |
| <i>GSH-Rd<br/>(nmol/ mg proteína)</i>   | 2,57 ± 1,35     | 1,46 ± 0,07               | 2,65 ± 1,35               | 1,13 ± 0,15 <sup>bc</sup>    |
| <i>GSSG<br/>(nmol / mg tecido)</i>      | 0,68 ± 0,14     | 1,32 ± 0,45 <sup>a</sup>  | 0,92 ± 0,36 <sup>a</sup>  | 0,86 ± 0,11 <sup>b</sup>     |
| <i>GSH<br/>(nmol / mg tecido)</i>       | 12,32 ± 1,13    | 12,70 ± 1,07              | 10,26 ± 1,52 <sup>a</sup> | 10,99 ± 0,41 <sup>b</sup>    |
| <i>GSH / GSSG</i>                       | 19,04 ± 5,05    | 10,46 ± 3,29 <sup>a</sup> | 12,02 ± 2,97 <sup>a</sup> | 12,85 ± 1,43                 |
| <i>Catalase / HP</i>                    | 6,53 ± 1,66     | 9,39 ± 5,27               | 7,54 ± 2,13               | 12,54 ± 4,93 <sup>c</sup>    |
| <i>SOD / HP</i>                         | 8,07 ± 2,48     | 11,95 ± 7,94              | 9,05 ± 2,68               | 14,22 ± 6,64 <sup>c</sup>    |
| <i>GSH-Px / HP</i>                      | 444,51 ± 274,97 | 699,85 ± 511,97           | 365,32 ± 167,37           | 902,43 ± 466,13 <sup>c</sup> |

Valores expressos em Média ± DP; p < 0,05.

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH.

(c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

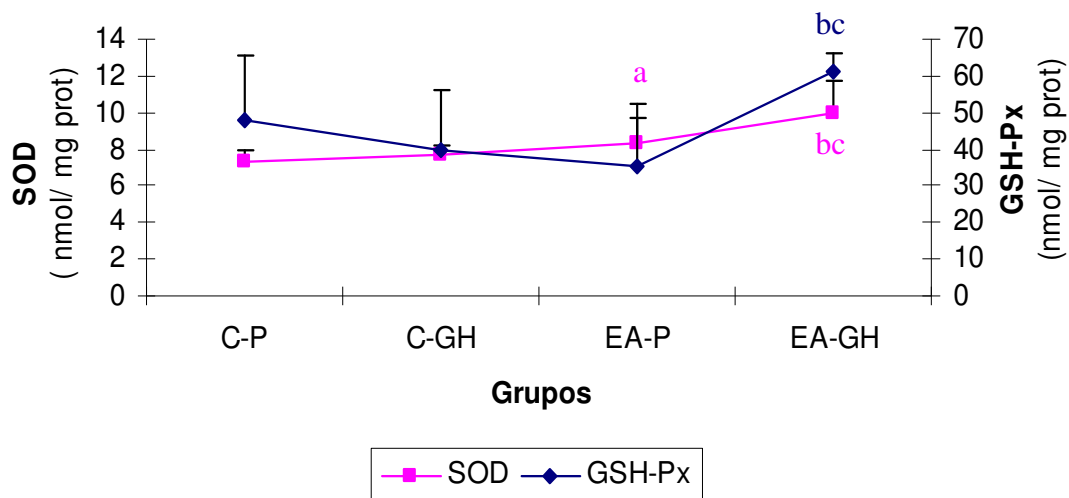


Figura 4 – Atividade das enzimas antioxidantes (nmol / mg proteína) superóxido dismutase (SOD) e glutationala peroxidase (GSH-PX) no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH). Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras minúsculas representam diferença entre linhas.

- (a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P
- (b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH
- (c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

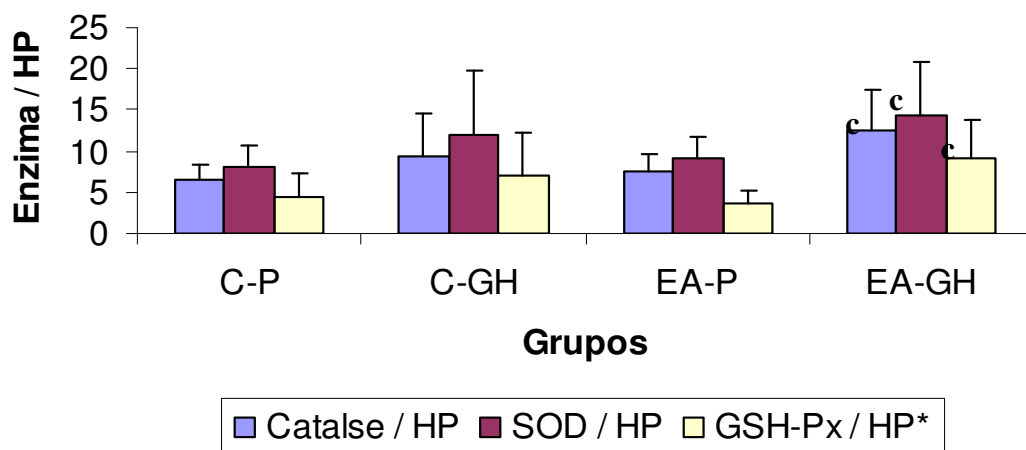


Figura 5 – Relações entre catalase / hidroperóxido de lipídio (HP), superóxido dismutase (SOD) / HP e glutathiona peroxidase (GSH-Px) / HP\* no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH).

Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras minúsculas representam diferença entre barras.

(c) Diferença significativa em relação ao grupo EA-P.

\*A relação GSH-Px / HP está dividida por 100.

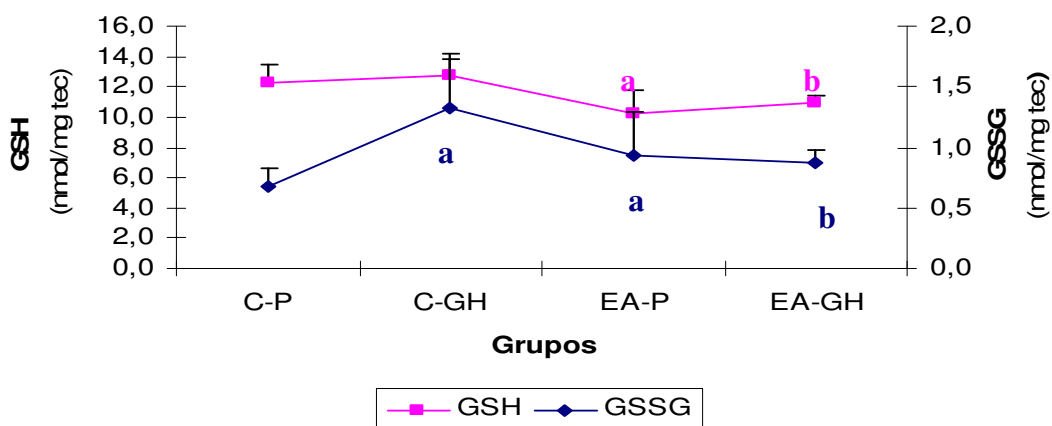


Figura 6 – Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), em nmol/mg tecido, no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH). Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras minúsculas representam diferença entre linhas.

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

(b) Diferença significativa em relação ao grupo C-GH

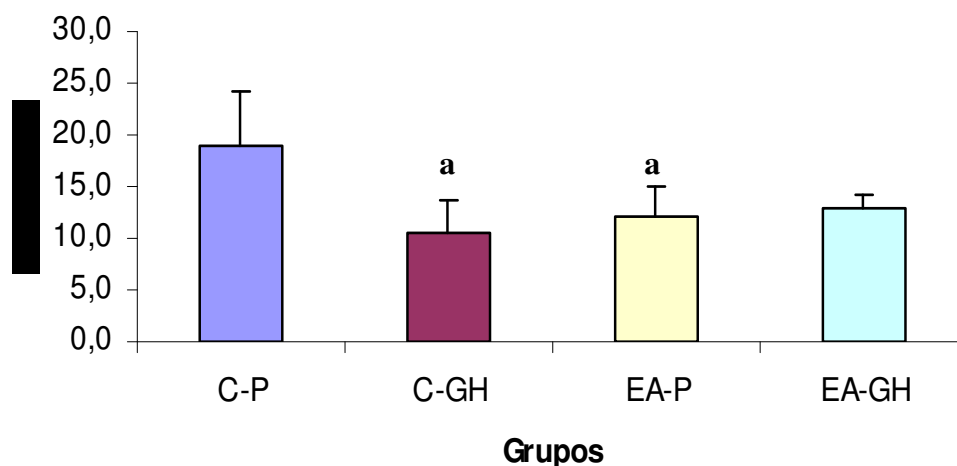


Figura 7 – Relação entre concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), no miocárdio de ratos controles (C-P), tratados com hormônio de crescimento (C-GH), submetidos à estenose aórtica (EA-P) e submetidos à estenose aórtica tratados com hormônio de crescimento (EA-GH). Valores expressos em Média  $\pm$  DP com  $p \leq 0,05$ .

Letras minúsculas representam diferença entre barras.

(a) Diferença significativa em relação ao grupo C-P

## Discussão

Desde o primeiro trabalho feito por Huchard, em 1985, mostrando a relação entre o sistema cardiovascular e o GH, vários pesquisadores vêm estudando a ação desse hormônio em problemas cardíacos. Embora já esteja clara a interação GH e coração, os resultados para o tratamento de cardiopatias com hormônio de crescimento são conflitantes (PÉREZ-BERBEL *et al.*, 2007). Alguns trabalhos apontam para uma melhora da função cardíaca (YANG *et al.*, 1993; FAZZIO *et al.*, 1996; CITTADINI *et al.*, 1997; TIVESTEN *et al.*, 2000) enquanto outros trabalhos não encontraram efeitos benéficos no coração após o tratamento com GH (OSTERZIEL *et al.*, 1998; ACEVEDO *et al.*, 2003). Deve-se, entretanto, notar que o maior problema em relação à IC está durante realização de exercícios físicos (WILSON *et al.*, 1984; WEBER *et al.*, 1982), o que foge dos objetivos deste estudo.

Embora haja grande número de trabalhos mostrando a importância do GH para o coração e muitos ainda indiquem um efeito terapêutico na IC, pouco se sabe sobre a influência desse hormônio na atividade de enzimas marcadoras do metabolismo energético do coração com IC, secundária à estenose aórtica. Desta forma este trabalho objetivou verificar os efeitos metabólicos e relacionados com o EO no tratamento com a dose de 1mg/kg de GH em ratos com IC secundária à estenose aórtica.

O tratamento com GH isolado não aumentou o ganho de PC, semelhante a outros trabalhos (TAJIMA *et al.*, 1999; CITTADINI *et al.* 2003). Embora o GH seja um hormônio anabólico, a dose utilizada neste trabalho é considerada baixa. Trabalhos com doses mais altas encontraram aumento significativo no PC (HONGO *et al.*, 2001; BRUEL *et al.*, 1999; GRIMM *et al.*, 1998; CITTADINI *et al.*, 1996). Os animais do grupo EA-P tiveram uma redução do seu PC final embora não tenha sido estatisticamente significativa. Isso se deu pelo alto desvio padrão desta variável. Todos os animais com EA foram agrupados de acordo com as variáveis ecocardiográficas, em EA grave (MOREIRA *et al.* 2006), entretanto, eram bastante heterogêneos em relação à idade, explicando assim, o elevado desvio padrão. Quando analisados os animais do grupo EA-GH é possível notar o efeito da EA na redução do peso corporal.

O tratamento com GH não elevou o PCo bem como a relação PCo/PC nos animais controle e com EA, em acordo com outros autores (YANG *et al.*, 1993; TANAKA *et al.*, 1998; TAJIMA *et al.* 1999), mostrando que o GH, nesta dose, não causou hipertrofia cardíaca sendo, portanto, uma dose segura. Já os grupos com EA apresentaram aumento no PCo e na relação PCo/PC, evidenciando uma possível resposta hipertrófica cardíaca (ISGAARD *et al.* 1997; TANAKA *et al.*, 1998) causada pela estenose, e que não foi agravada pelo tratamento com GH.

A manutenção no ganho de peso e no PCo nos animais que receberam GH foi associada à dose de GH utilizada neste trabalho. Cittadini *et al.*, (1996) utilizando uma dose maior de GH mostraram uma resposta hipertrófica cardíaca. Embora a dose utilizada tenha sido inferior a outros trabalhos pode-se confirmar a ação do GH através

da produção aumentada de IGF-I, nos animais que receberam o tratamento. A concentração diminuída de IGF-I nos animais com IC supõe uma possível resistência à ação do GH na IC, em acordo com outros trabalhos (ISGGARD *et al.*, 1997). Uma vez que o IGF-I é um efector importante das ações do GH, essa redução explica, ao menos em parte, as alterações no grupo EA-P.

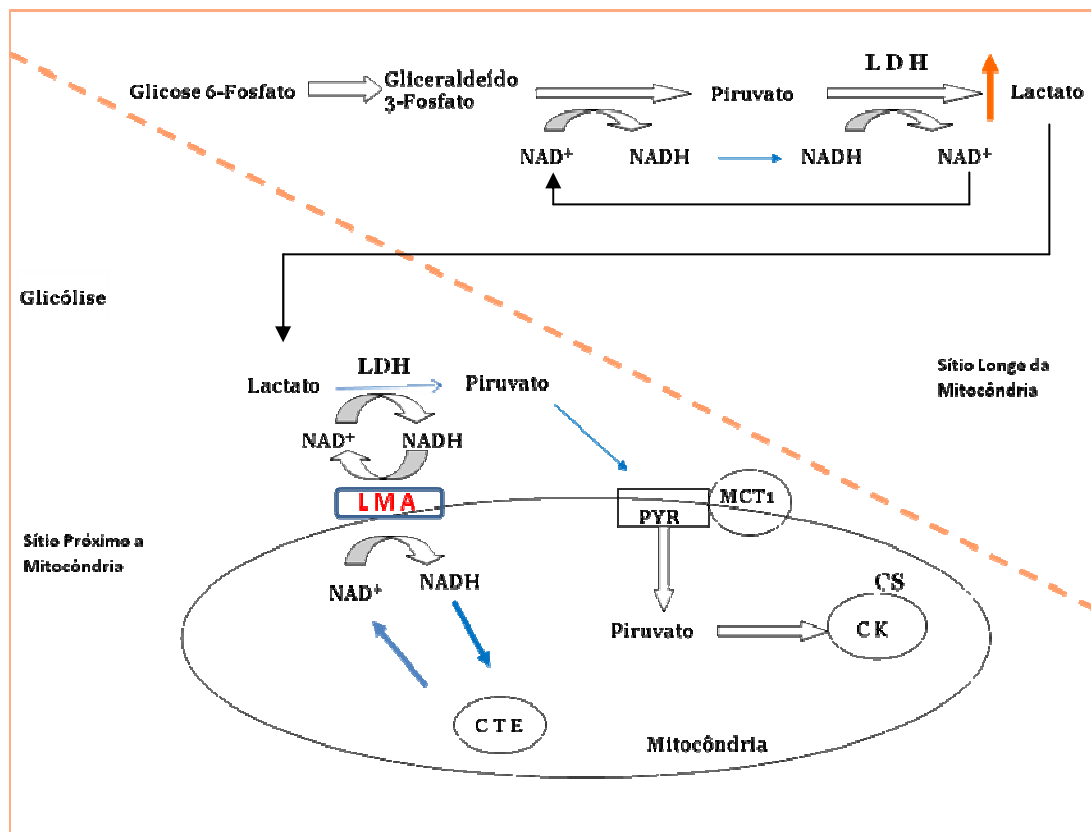
Caquexia, que muitas vezes acompanha a IC (ABEL *et al.*, 1976), é um estado no qual ocorre alto grau de catabolismo, com depleção das reservas protéicas e perda de peso (ANKER *et al.*, 1997). Embora os resultados não permitam afirmar esse desequilíbrio entre anabolismo e catabolismo, esse fato poderia explicar a redução da porcentagem de proteína no grupo EA-P (SPINALE *et al.*, 1995; EBLE *et al.*, 1997). Essa redução também ocorreu no grupo EA-GH, mostrando novamente a influência da EA no balanço metabólico do coração. Surpreendentemente, o GH não conseguiu aumentar a concentração de proteína miocárdica uma vez que já está bem estabelecida sua propriedade anabólica (HJALMARSON *et al.*, 1969; TANAKA *et al.*, 1998). Isso se deve a dose utilizada, embora não seja possível descartar a idéia de que o coração dos animais, por estarem em IC por um tempo prolongado, não responda da mesma forma ao tratamento com GH. RYOKE *et al.*, (1999) mostraram que diferentes estágios de IC respondem de forma distinta ao tratamento com GH. Cabe também ressaltar que as proteínas quantificadas neste estudo são as proteínas solúveis e não proteínas estruturais que seriam influenciadas pelo efeito anabólico do GH.

A fibrose miocárdica é considerada um determinante biológico associado com um mau prognóstico na IC (BRUTSACRT *et al.*, 1989; CITTADINI *et al.* 2003). Aumento na concentração de colágeno no coração foi demonstrado em vários modelos de hipertrofia cardíaca (LIMOTO *et al.* 1988; MEDUGORAC *et al.*, 1980; BRUEL *et al.* 1999). Concordando com outros estudos (CITTADINI *et al.* 2003; GRIMM *et al.*, 1998) houve um aumento do índice de fibrose (IF) no grupo EA-P comparado com seu controle e esse índice reduziu significativamente no grupo EA-GH. BRÜEL *et al.*, (1995) mostraram que o GH influencia o metabolismo de colágeno no tecido cardíaco. Em

alguns trabalhos o GH elevou o peso do coração sem levar a um aumento significativo na fibrose miocárdica (CITTADINI *et al.*, 1996; STROMER *et al.*, 1996). Algumas hipóteses poderiam explicar a redução do IF no grupo tratado com GH: 1) o efeito antiapoptótico do GH e/ou IGF-I. Embora a apoptose não cause diretamente fibrose, o espaço deixado pela morte celular pode ser preenchido com fluido intersticial seguido de fibrose (CITTADINI *et al.*, 2003); 2) GH e/ou IGF-I podem reduzir a síntese ou aumentar a quebra de colágeno e fibronectina (GRIMM *et al.*, 1998); 3) o tratamento com GH leva a uma hipertrofia dos cardiomiócitos nas áreas não-infartadas, diminuindo assim o estresse de parede diastólico (OLIVETTI *et al.*, 1991). Dessa forma, o GH ou o IGF-I agiria de uma forma preventiva sobre o processo fibrótico (BERANCK, 1999).

Embora a estenose “*per se*” não tenha alterado as enzimas marcadoras do metabolismo cardíaco analisadas neste estudo, o tratamento com GH elevou as atividades enzimáticas semelhantemente ao grupo C-GH.

O grupo C-GH apresentou elevação nas atividades da enzima LDH e CS, marcadoras do metabolismo anaeróbico e aeróbico, respectivamente. Segundo Stainsby & Brooks (1990) altas concentrações de lactato formadas no citosol, em sítios distantes das mitocôndrias, são levados a sítios próximos dessas organelas por diferença de concentração. Esse excesso de lactato é oxidado a piruvato, mantendo constante a relação NADH/ NAD<sup>+</sup> para a manutenção das reações celulares mitocondriais (via lançadeira do aspartato / malato), explicando assim o aumento da atividade da enzima LDH. O piruvato formado entra nas mitocôndrias através de carreadores de membrana específicos (PYR e MCT1) e é então oxidado para entrar no ciclo de Krebs, elevando assim a atividade da enzima citrato sintase (Esquema III).

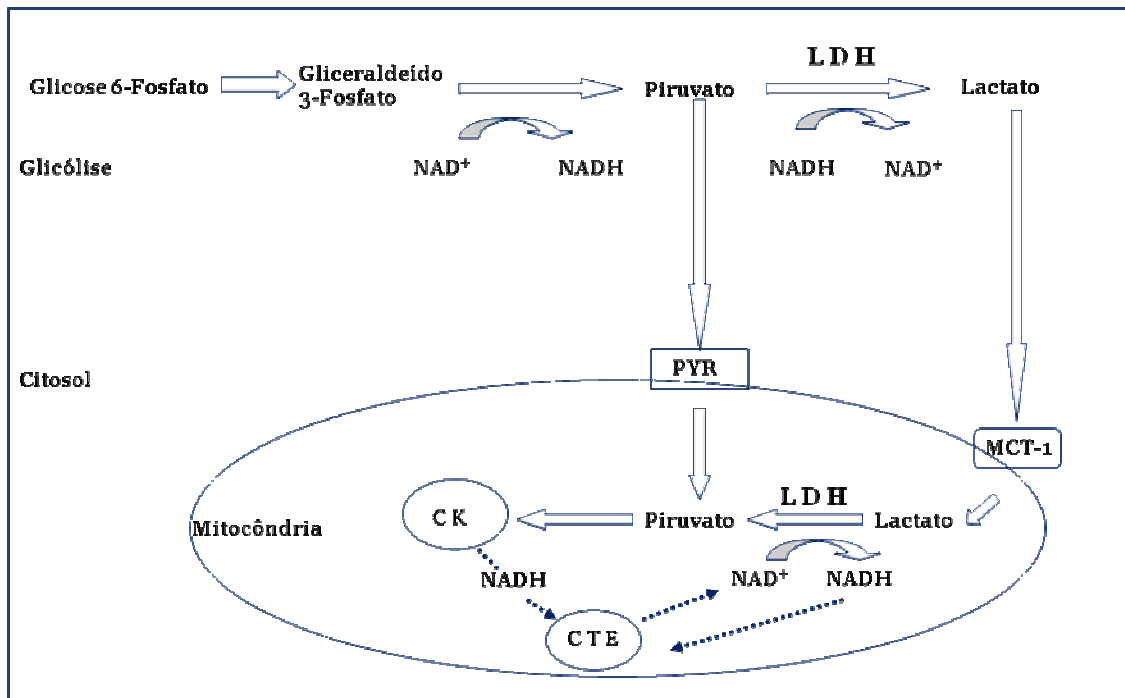


Esquema III – Desvio Intracelular do lactato (Stainsby & Brooks, 1990). LDH – Lactato Desidrogenase, MCT-1 – Transportador de monocarboxilato, CS – Citrato Sintase, CTE – Cadeia Transportadora de elétrons, LMA – Lançadeira Malato-Aspartato.

Uma hipótese alternativa é o desvio intracelular do lactato proposto por Gladden (2001) (Esquema IV), na qual o lactato produzido no citosol, pela atividade de uma isoenzima da LDH, entra na mitocôndria diretamente e então é oxidado novamente a piruvato, entrando assim no ciclo de Krebs, gerando os equivalentes redutores para as reações produtoras de energia. Ambas as hipóteses explicam o aumento das atividades da CS e LDH induzidas pelo GH.

O grupo EA e que recebeu o GH apresentou elevação nas atividades da LDH e  $\beta$ -OH e redução na atividade da enzima marcadora do metabolismo aeróbico, CS.

Dentre as ações exercidas pelo GH está a lipólise (JORGENSEN *et al.*, 1993, KOUSTA *et al.*, 2000). Com a liberação de ácidos graxos para a corrente sanguínea ocorre aumento da oxidação de ácidos graxos, elevando a atividade da enzima  $\beta$ -OH no grupo EA-GH, bem como a relação OHADH/ CS.



**Esquema IV – Desvio Intracelular do lactato (Gladden, 2001). LDH -Lactato Desidrogenase, MCT-1 – Transportador de monoCarboxilato, CK – Ciclo de Krebs, CTE- Cadeia Transportadora de elétrons**

Sabe-se que a oxidação de AGs leva a uma maior produção de citrato e esse é um inibidor alostérico da enzima fosfofrutokinase (PFK-1), desta forma reduzindo a velocidade da via glicolítica, portanto menos piruvato estaria sendo formado via glicólise. Aumento na disponibilidade de lipídios também eleva a atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) quinase, que por sua vez fosforila o complexo PDH, tornando-o inativo (CARVAJAL e MORENO-SANCHEZ, 2002); desta maneira o piruvato formado na via glicolítica é desviado para a redução até lactato, explicando o aumento da atividade da LDH a partir do aumento da oxidação de lipídios.

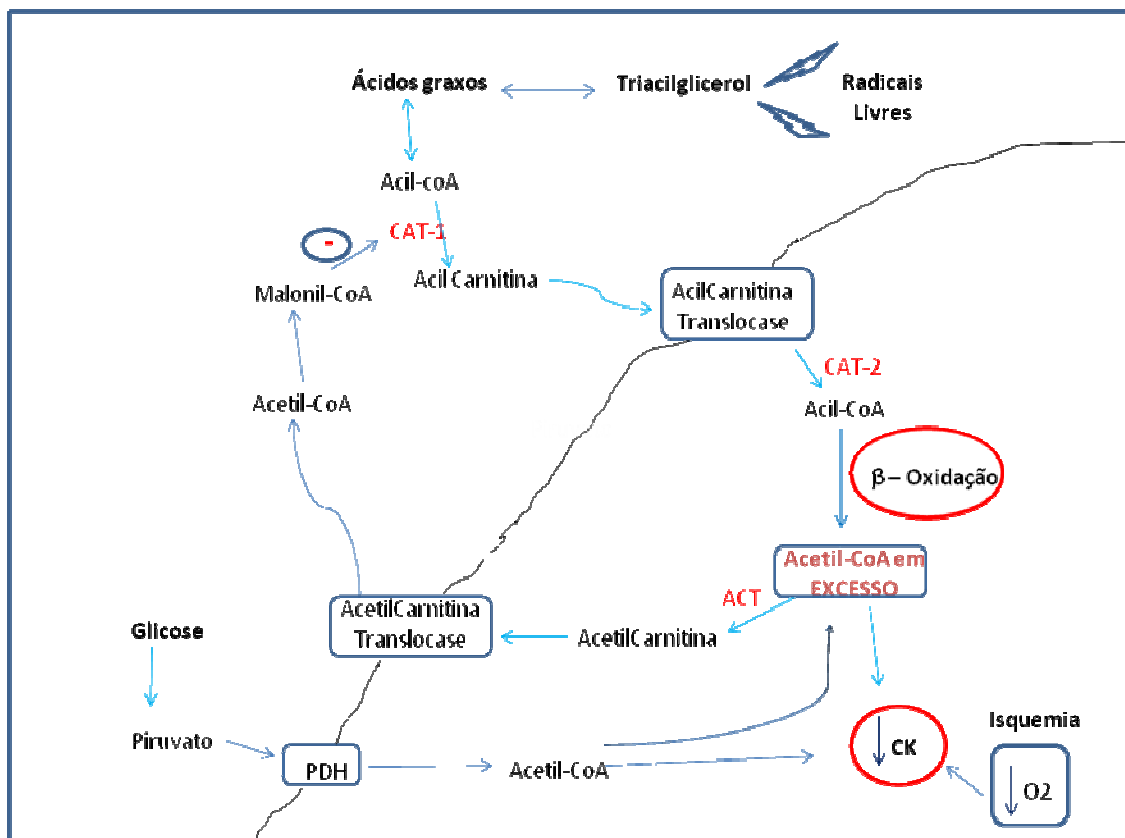
A redução da atividade da enzima CS no grupo EA-GH pode ter sido causada pela baixa concentração de oxigênio que chega até o coração com IC. A produção de energia na cadeia transportadora de elétrons é bastante sensível a alterações nas concentrações de O<sub>2</sub>, desta forma condições de hipóxia diminuiriam a atividade da CS, reduzindo assim a produção de energia via metabolismo aeróbico. Uma vez que o GH é um hormônio com atividade anabólica, isto é, promove reações que necessitam de energia, e essa energia requer suprimento de O<sub>2</sub> adequado, a redução na atividade da CS ocorreu apenas no grupo que recebeu o GH e não no grupo EA-P. Trabalhos recentes

têm apontado para os efeitos energéticos benéficos da produção de lactato e piruvato no coração (GLADDEN, 2004; MALLETT *et al.*, 2005), desta forma o GH, corroborando com estes trabalhos, levaria a efeitos benéficos em relação ao metabolismo energético cardíaco.

Embora os efeitos metabólicos causados pelo aumento da oxidação de ácidos graxos não tenha prejudicado a produção de energia miocárdica, uma das consequências do aumento da  $\beta$ -oxidação é a formação indireta de triacilglicerol. Em condições de isquemia há uma diminuição da atividade da enzima CS, desta forma menos acetil-CoA é oxidado no ciclo do citrato. O excesso deste intermediário oriundo tanto da via glicolítica, como da  $\beta$ -oxidação é devolvido ao citosol, formando malonil-CoA, que por sua vez inibe a atividade da enzima carnitina-acil-transferase 1 (CAT-1), responsável pela entrada de acil-CoA formado a partir dos AGs. Desta forma há um mecanismo de feedback negativo que eleva a formação de triacilglicerol miocárdico, sendo um substrato altamente susceptível ao ataque pelos RLs (Esquema V). Neste trabalho não foram quantificadas as concentrações de triacilglicerol miocárdico.

O GH, neste estudo, apresentou efeitos benéficos em relação aos parâmetros oxidativos do coração com estenose aórtica.

O GH no grupo C não elevou a concentração dos marcadores do estresse oxidativo, HP, SAT e relação HP/SAT, o que mostra que nesta dose o GH não causou efeitos deletérios no miocárdio. A única alteração causada pelo GH foi a diminuição da relação GSH/GSSG, causada unicamente pelo o aumento do GSSG.



Esquema V- Formação de triacilglicerol a partir do excesso de acetil-CoA formado pela oxidação de ácidos graxos. CAT – Carnitina Acil Transferase, CK – Ciclo de Krebs, ACT – Acetil Carnitina Translocase, PDH, Piruvato Desidrogenase.

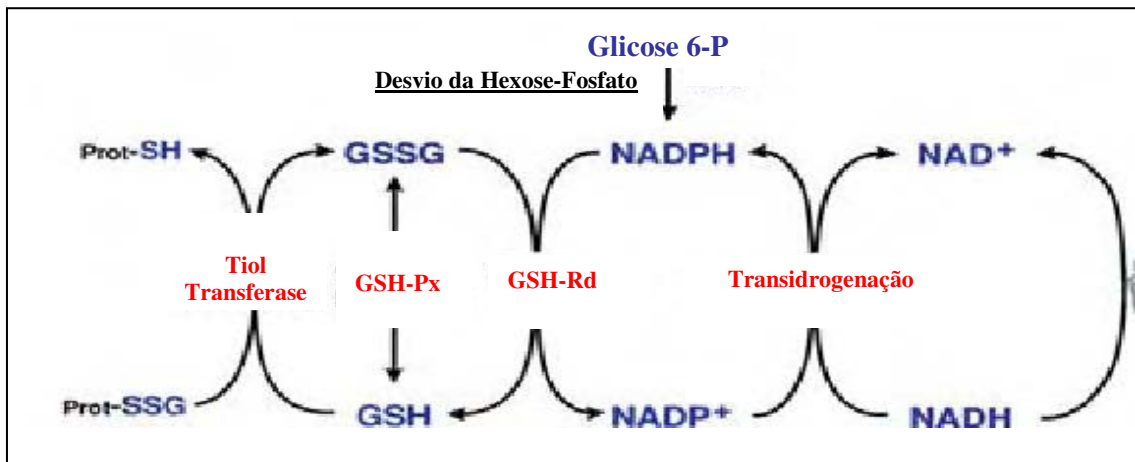
Embora o grupo EA-P também não tenha apresentado elevação do HP, SAT e HP/SAT, neste grupo ocorreu redução na relação GSH/GSSG, tanto pelo aumento da GSSG como pela diminuição da GSH. A relação diminuída GSH/GSSG (DE LA CRUZ *et al.*, 1999), associada com a elevação da enzima antioxidante SOD, indica um dano maior causado pelos RLs, devido a IC. Embora tenha ocorrido aumento no EO no grupo EA-P, em acordo com outros trabalhos (BELCH *et al.*, 1991; McMURRAY *et al.* 1993; KEITH *et al.*, 1998), a manutenção nos níveis de HP pode ser decorrente da proteção causada pelo aumento adaptativo (SINGAL & KIRSHENBAUM, 1990) da atividade da enzima SOD. Esta enzima promove a dismutação do  $O_2^-$  até  $H_2O_2$ , evitando os danos causados por esse RL. Já a produção de  $H_2O_2$  é neutralizada pelo sistema das glutations, tanto enzimaticamente como diretamente. A glutationa reduzida é um tripeptídeo tiólico ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) com ação antioxidante através da doação de hidrogênio, convertendo-se em GSSG, desta forma reduzindo a ação das EROs.

Neste estudo, no grupo EA-P não houve alteração das enzimas GSH-PX e GSH-Rd, mostrando que o  $H_2O_2$  foi neutralizado pela ação direta da GSH.

O grupo com EA que recebeu o tratamento com GH teve redução nos níveis de HP, apontando para o efeito protetor do GH. Essa redução está associada com o aumento das relações SOD/HP, catalase/HP e GSH-Px/HP, mostrando o efeito redutor de EO do GH. Segundo Oteiza *et al.* (1997) a relação entre os sistemas antioxidantes/oxidante deve ser considerada como sendo mais representativa que o valor absoluto das atividades enzimáticas, embora neste estudo as atividades absolutas das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase também tenham aumentado no grupo tratado e com EA. A atividade aumentada da SOD no grupo EA-GH comparada com o grupo EA-P pode estar relacionada com o aumento da produção de  $O_2^-$  causado pelo GH (ROLLO *et al.*, 1996), desta forma, o coração necessitaria de uma maior proteção para evitar os efeitos nocivos deste RL.

No grupo EA-GH, a atividade elevada da SOD levou a maior produção de  $H_2O_2$ , entretanto este foi neutralizado pela atividade da enzima GSH-Px, comprovado pela diminuição na concentração de GSH. Já a diminuição na concentração de GSSG, bem como redução na atividade da GSH-Rd, enzima que converte a forma oxidada da glutathione à forma reduzida, podem estar associadas com uma diminuição da via do 6-fosfogliconato (ou desvio da hexose-fosfato). Sabe-se que essa via é de importância relevante na produção de compostos redutores, como o NADPH, que por sua vez são doadores de elétrons para a redução da GSSG a GSH (Esquema VI), reação catalisada pela GSH-Rd, explicando desta forma, a diminuição da atividade enzimática, que mesmo assim, conseguiu reduzir GSSG à GSH de forma eficiente, evitando o EO.

Ainda em relação à manutenção na concentração de HP no grupo com estenose, uma das hipóteses para explicar tal fato está relacionada com o efeito antioxidante do piruvato (MALLET *et al.*, 2005), o qual é capaz de formar  $CO_2$  e  $H_2O$  a partir do  $H_2O_2$ , produzindo assim acetato.



Esquema VI – Interação entre o desvio das pentoses e o sistema das glutatonas.

Os resultados obtidos indicaram, portanto, que os antioxidantes não enzimáticos contribuíram consideravelmente para impedir a elevação no HP miocárdico no grupo EA-P.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS.

O hormônio de crescimento desperta bastante interesse como uma terapêutica complementar para algumas doenças cardiovasculares.

Embora haja resultados conflitantes sob a eficácia e a forma de ação do GH no tratamento da IC, várias explicações foram propostas para a melhora da função cardíaca após o tratamento com GH. Fazio *et al.*, (1996) e Genth-Zotz *et al.*, (1999) mostraram melhora da função ventricular esquerda. Dentre alguns possíveis mecanismos de ação deste hormônio, podem ser citados a capacidade de: diminuir a resistência vascular periférica, aumentar a capacidade geradora de força dos miofilamentos cardíacos aumentando a função contrátil, preservar a integridade dos canais sarcoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ , evitar a fibrose miocárdica das áreas saudáveis do coração, diminuir a apoptose celular e aumentar a síntese protéica cardíaca levando a uma hipertrofia ventricular benéfica (FERRARI *et al.*, 1990; STRÖMER *et al.* 1996; NISHIYAMA *et al.*, 1998; UHEYAMA *et al.*, 1998; GRIMM *et al.*, 1998; TAJIMA *et al.*, 1999; HOUCK *et al.*, 1999; CECONI *et al.*, 2003).

Este estudo mostrou que o GH também é capaz de modular enzimas importantes relacionadas com o metabolismo cardíaco, bem como alterar as atividades de algumas

enzimas antioxidantes, uma vez que já está bem estabelecido o papel crucial do EO no desenvolvimento e na progressão de várias doenças cardíacas, e também a importância da manutenção de vias metabólicas íntegras para o correto funcionamento do coração, este trabalho aponta para outros possíveis caminhos, como a redução na produção de radicais livres, pelos quais o GH poderia levar a uma melhora da função ventricular esquerda e, como consequência, do prognóstico da IC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL RM, FISCHER J, BUCKLEY MJ, *et al.* Malnutrition in cardiac surgical patients. **Arch Surg.** 111: 45-50, 1976.
- ACEVEDO M, CORBALÁN R, CHAMORRO G, *et al.* Administration of growth hormone to patients with advanced cardiac heart failure: effects upon left ventricular function, exercise capacity, and neurohormonal status. **Int J Cardiol.** 87: 185-91, 2003.
- AEBI H. **Methods of enzymatic analysis.** 2<sup>a</sup> ed. (New York): Bergmeyer H. V. Editor Verlag Chemie Weinheim, v 1, 2, 3 e 4, 1974.
- AMATO G, CARELLA C, FAZIO S, *et al.* Body composition, bone metabolism, heart structure and function in growth hormone deficient adults before and after growth hormone replacement therapy at low doses. **J Clin Endocrinol Metab.** 77: 1671-76, 1993.
- ANKER SD, CHUA TP, PONIKOWSKI P, *et al.* Hormonal changes and catabolic / anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. **Circ.** 96: 526-34, 1997.
- ANKER SD, VOLTERRANI M, PFLAUM CD, *et al.* Acquired growth hormone resistance in patients with chronic heart failure: implications for therapy with growth hormone. **J Am Coll Cardiol.** 38(2): 443-52, 2001.
- BASS A, *et al.* Metabolic differentiation of distinct muscle at the level of enzymatic organization. **Eur J Biochem.** 10: 198-206, 1969.
- BATES AS, VAN'T HOFF W, JONES PJ, *et al.* The effect of hypopituitarism on life expectancy. **J Clin Endocrinol Metab.** 81: 1169-72, 1996.
- BELCH JJF, BRIDGES AB, SCOTT N, *et al.* Oxygen free radicals and congestive heart failure. **Br Heart J.** 65: 245-8, 1991.

- BERANCK JT. Does growth hormone reduces fibrosis? **Cardiovasc Res.** 43: 252-3, 1999.
- BROWN-BORG HM, BODE AM, BARTKE A. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone Levels: Potencial relationship in the aging process. **Endocrine.** 11: 41-8, 1999.
- BROWN-BORG HM, RAKOCZY SG, ROMANICK MA, *et al.* Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes. **Exp Biol Med.** 227(2): 94-104, 2002.
- BROWN-BORG HM, RAKOCZY SG. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mech Ageing Dev.** 124 (10-12):1013-24, 2003.
- BRÜEL A, OXLUND H. Biosynthetic growth hormone increases the collagen deposition rate in rat aorta and heart. **Eur J Endocrinol.** 132: 195-99, 1995.
- BRÜEL A, OXLUND H. The effect of growth hormone on rat myocardial collagen. **Growth Horm IGF Res.** 9: 123-30, 1999.
- BRUTSACRT DL, SYS SU. Relaxation and diastole of the heart. **Physiol Rev.** 1228-312, 1989.
- CARVAJAL K, BANÑOS G, MORENO-SANCHEZ R. Impairment of glucose metabolism and energy transfer in rat heart. **Mol Cell Biochem.** 249: 157-65, 2003.
- CARVAJAL K, MORENO-SANCHEZ R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. **Arch Med Res.** 34: 89-99, 2002.
- CARVALHO RF, CICOGNA AC, CAMPOS GE, *et al.* Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **Intern J Exp Pathol.** 84 (4): 201-06, 2003.
- CAVE A, GRIEVE D, JONHAR S. *et al.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. **Phil Trans R Soc B.** 360: 2327-34, 2005.
- CECONI C, BORASO A, CARGNONI A, *et al.* Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? **Arch Biochem Biophys.** 420: 217-21, 2003.
- CHANCE B, SIES HE, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.** 59: 527-605, 1979.
- CICOIRA M, KARLA PR, ANKER SD. Growth hormone resistance in chronic heart failure and its therapeutic implications. **J Card Fail.** 9(3): 219-26, 2003.
- CITTADINI A, STRÖMER H, KATZ SE, *et al.* Differential Cardiac effects of growth hormone and insulin like growth factor- 1 in the rat. **Circ.** 93, 800-09, 1996.
- CITTADINI A, GROSSMAN JD, NAPOLI R, *et al.* Growth hormone attenuates early ventricular remodeling and improves cardiac functions in rats with large myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol.** 29: 1109-16, 1997.

- CITTADINI A, ISGAARD J, MONTI MG, *et al.* Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. **J Am Coll Cardiol.** 18(12): 2154-63, 2003.
- CLARK SF. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutr Clin Pract.** 17: 5-17, 2002.
- COETZEE IH, LOCHNER A. Free radical effects on myocardial membrane microviscosity. **Cardioscience.** 4: 205-15, 1993.
- CUOCOLO A, NICOLAI E, FAZIO S, *et al.* Empaired left ventricular diastolic filling in patient with acromegaly: assessment with radionucleid angyography. **J Nucl Med.** 36: 196-201, 1995.
- DE BOER H, BLOCK GJ, VAN DER VEEN. Clinical aspects of growth hormone deficiency. **Endocrine Reviews.** 16: 63-86, 1995.
- DE LA CRUZ JP, QUINTERO L, VILLALOBOS MA, *et al.* Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipidemic rabbits: influence of olive oil administration. **Biochim Biophys Acta.** 1485: 36-44, 2000.
- DHALLA NS, KAURA D, LIU X. *et al.* Mechanisms of subcellular remodelling in post-infarct heart failure. **EXS.** 76: 463-77, 1996.
- EBLE DM, WALKER JD, MUKHERJEE R, *et al.* Myosin heavy chain synthesis is increased in a rabbit model of heat failure. **Am J Physiol.** 272:H969-78, 1997.
- ELSBACH P, WEISS P. A revaluation of the roles of O<sub>2</sub><sup>-</sup> dependent and O<sub>2</sub><sup>-</sup> independent microbicidal systems of phagocytes. **Rev Infect Dis.** 5: 843-53, 1983.
- EWING J.F.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. **Anal Chem.** 232: 243-248, 1995.
- FAZIO S, SABATINI D, CAPALDO B, *et al.* A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. **N Engl J Med.** 334: 809-14, 1996.
- FERRARI R. The role of free radicals in ischaemic myocardium. **Br J Clin Pract.** 44(8): 301-5, 1990.
- FERRARI R, CECONI C, CURELLO S. Intracelular effects of myocardial ischaemic and reperfusion: role of calcium and oxygen. **Eur Heart J.** 7: 3-12, 1998.
- FLOHE L, GUNZLER WA. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 105: 114-21, 1984.
- GENTH-ZOTZ S, ZOTZ R, GEIL S, *et al.* Recombinant growth hormone therapy in patients with ischemic cardiomyopathy: Effects on hemodynamics, left ventricular function, and cardiopulmonary exercise capacity. **Circ.** 99: 18-21, 1999.
- GLADEN LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **J Physiol.** 1;558(Pt 1):5-30, 2004.

- GLADEN LB. Lactic acid: New roles in a new Millennium. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Jan 16;98(2):395-7, 2001
- GONÇALVES G, ZORNOFF LA, RIBEIRO HB, *et al.* O Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. **Arqu Bras Cardiol.** 84: 304-08, 2005.
- GRIMM D, CAMERON D, GRIESE DP, *et al.* Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. **Cardiovas Res.** 40(2): 297-306, 1998.
- GROESBECK MD, PARLOW AF. Highly improved precision of the hypophysectomised female rat body weight gain bioassay for growth hormone by increased frequency of injections, avoidance of antibody formation, and other simple modifications. **Endocrinol.** 120(6): 2582-90, 1987.
- GUPTA M, SINGAL PK. Time course of structure, function and metabolic changes due to an exogenous source of oxygen metabolites in rat heart. **Can J Physiol Pharmacol.** 67:1549-59, 1989.
- HALLIWELL B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radic Res.** 31(4): 261-72, 1999.
- HENNING SI, WAMBOLT RB, SCHONCKESS BO. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. **Circ.** 93: 1549-55, 1996.
- HJALMARSON A, ISAKSSON O, AHREN K. Effects of growth hormone and insulin on amino acid transport in perfused heart rat. **Am J Physiol.** 217:1795-1802, 1969
- HO KKL, PINSKY JL, KANNEL WB, LEVY D. The epidemiology of heart failure: the Framingham study. **J Am Coll Cardiol.** 22: 6A-13, 1993.
- HONGO M, HIRONAKA E, YOKOSEKI O, *et al.* Effects of growth hormone following chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in chronic heart failure: their relation to infarct size. **Cardiovas drugs ther.** 15: 241-49, 2001.
- HOUCK WV, PAN LC, KRIBBS SB, *et al.* Effects of growth hormone supplementation on left ventricular morphology and myocytes function with the development of congestive heart failure. **Circ.** 100: 2003-9, 1999.
- HUCHARD H. Anatomie pathologique, lesions et trouble cardiovasculaires de l'acromegalie. **J Practiciens.** 9: 249-50, 1995.
- ISGAARD J, KUJACK V, JENNISCHE E, *et al.* Growth hormone improves cardiac function in rats with experimental myocardial infarction. **Eur J Clin Invest.** 27 (6): 517-25, 1997.
- JADRESIC A, BANKS LM, CHILD DF, *et al.* The acromegaly syndrome. Relation between clinical features, growth hormone values and radiological characteristics of the pituitary tumours. **Q J Med.** 51(202):189-204, 1982

- JIANG ZY, WOOLLARD, AC, WOLF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. **Lipids**. 26: 853-56, 1991.
- JONES JI, CLEMMONS DR. Insulin like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr. Rev.** 16: 3-34, 1995.
- JORGENSEN JO, MOLLER J, ALBERTI KG, *et al* Marked effects of sustained low growth hormone (GH) levels on day-to-day fuel metabolism: studies in GH-deficient patients and healthy untreated subjects. **J Clin Endocrinol Metab.** 77(6):1589-96, 1993.
- KANEKO M, MATSUMOTO Y, HAYASHI H. *et al*. Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. **Mol Cell Biochem.** 139: 91-100, 1994.
- KATO S, SPINALE FG, TANAKA R, JOHNSON W. Cooper G 4th, Zile MR. Inhibition of collagen cross-linking: effects on fibrillar collagen and ventricular diastolic function. **Am J Physiol.** 269:H863-8.1995
- KEITH M, GERANMAYEGAN A, SOLE MJ. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. **J Am Coll Cardiol.** 31: 1352-56, 1998.
- KONTOLEON PE, ANASTASIOU-NANA MI, PAPAPETROU PD, *et al*. Hormonal profile in patients with congestive heart failure. **Int J Cardiol.** 87(2-3): 179-83, 2003.
- KOUSTA E, CHRISOULIDOU A, LAWRENCE NJ, *et al*. The effects of growth hormone replacement therapy on overnight metabolic fuels in hypopituitary patients. **Clin Endocrinol.** 52(1):17-24, 2000.
- LEFER DJ, GRANGER ND. Oxidative stress and cardiac disease. **Am J Med** 109: 315-323, 2000.
- LIE JT, GROSSMAN SI. Pathology of the heart in acromegaly anatomic findings in 27 autopsied patients. **Am Heart J.** 100: 41-52, 1980.
- LIMOTO DS, COVELL JW, HARPER E. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. **Circ Res.** 63: 399-408, 1988.
- LOMBARDI G, COLAO A, MARZULLO P, *et al*. Is growth hormone bad for your haert? Cardiovascular impact of GH deficiency and of acromegaly. **J Endocrinol.** 155: S33-37, 1997.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 193(1): 265-75, 1951.
- MAISON P, CHANSON P. Cardiac effects of growth hormone in adults with growth hormone deficiency: a meta-analysis. **Circ.** 25(21): 2648-52, 2003.

- McMURRAY J, CHOPRA M, ABDULLAH I, *et al.* Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. **Eur Heart J.** 14: 1493-8, 1993.
- MALLET RT. Pyruvate: Metabolic protector of cardiac performance. **Proc Soc Exp Biol Med.** 223(2):136-48, 2000.
- MALLET RT, SUN J. Antioxidant properties of myocardial fuels. **Mol Cell Biochem.** 253: 103-11, 2003.
- MEDUGORAC I. Myocardial collagen in different forms of heart hypertrophy in the rat. **Res Exp Med.** 177: 201-11, 1980.
- MEHMETCIK G, TOKER G, UYSAL M. Endogenous and copper-induced lipid hydroperoxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. **Horm Metab Res.**29:63-65, 1997.
- MEROLA B, CITTADINI A, COLAO A, *et al.* Cardiac structural and functional abnormalities in adults patients with growth hormone deficiency. **J Clin Endocrinol Metab.** 77: 1658-61, 1993.
- MILLER AC, BLAKELY WF. Inhibition of glutathione reductase activity by a carbamoylating nitrosourea: effect on cellular radiosensitivity. **Free Radic Biol Med.** 12 (1): 53-62, 1992.
- MOREIRA VO, CASTRO AVB, YATEGASHI MY, *et al.* Echocardiographic Criteria for the Definition of Ventricular Dysfunction Severity in Aortic Banded Rats. **Arq Bras Cardiol.** 86(6): 2006.
- MOURA RA. **Técnicas de laboratório**. 2<sup>a</sup> ed., (São Paulo): Atheneu Editora, 1982. 822.
- NAKAMURA W, HOJODA, S, HAYASHI K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta.** 358: 251-261, 1974.
- NELLY JR, MORGAN HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and energy balance of heart muscle. **Ann Ver Physiol.** 36: 413-59, 1974.
- NISHIYAMA Y, IKEDA H, HARAMAKI N, *et al.* Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. **Am Heart J.** 135: 115-20, 1998.
- NOVELLI ELB. Metabolismo energético. In: **Nutrição e vida saudável. Estresse oxidativo e metabolismo energético.** 3: 51-66, 2005.
- OLIVETTI G, CAPASSO JM, MEGGS LG, *et al.* Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **Circ Res.** 68: 856-69, 1991.
- OSTERZIEL KJ, STROHM O, SCHULER J, *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with CHF due to dilated cardiomyopathy. **Lancet.** 351: 1233-7, 1998.

- OTEIZA PI, UCHITEL OD, CARRASQUEDO F, *et al.* Evaluation of antioxidants, protein, and lipid oxidation products in blood from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. **Neurochem Res.** 22(4): 535-39, 1997.
- PENDERGRASS WR, LI Y, JIANG D, *et al.* Decrease in cellular replicative potential in "giant" mice transfected with the bovine growth hormone gene correlates to shortened life span. **J Cell Physiol.** 156(1): 96-103, 1993.
- PÉREZ- BERBEL P, CLIMENT VE, PICÓ A, *et al.* Short - and long-term effects of growth hormone on the heart. **Int J Cardiol.** In Press, 2007.
- PICHARDO J, PALACE V, FARAHMAND F, *et al.* Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. **Mol Cell Biochem.** 196: 51-7, 1999.
- RANKE MB. Insulin-Like growth factor I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance. **TEM.** 16: 190-97, 2005.
- RICE-EVANS C, MILLER N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods Enzymology.** 234: 279-93, 1994.
- ROLLO CD, CARLSON J, SAWADA M. Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radicals process. **Can J Zool.** 74: 606-20, 1996.
- ROSÉN T, BENGTSSON A. Premature cardiovascular mortality in hypopituitarism – a study of 333 consecutive patients. **Lancet.** 336: 285-88, 1990.
- RYOKE T, GU Y, MAO L, *et al.* Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of GH and angiotensin-converting enzyme inhibition. **Circ.** 100: 1734-43, 1999.
- SACCÀ L, CITTADINI A, FAZIO S. Growth hormone and the heart. **Endocr Rev.** 15: 555-73, 1994.
- SACCÀ L. Growth hormone: a newcomer in cardiovascular medicine. **Cardiovas Res.** 36: 3-9, 1997.
- SACCÀ L, NAPOLI R, CITTADINI A. Growth hormone, acromegaly, and heart failure: an intricate triangulation. **Clin Endocrinol (Oxf).** 59(6): 660-71, 2003
- SINGAL PK, KIRSHENBAUN LA. A relative deficit in antioxidant reserve may contribute in cardiac failure. **Can J Cardiol.** 6: 47-9, 1990.
- SIWIK DA, TZORTIS JD, PIMENTAL DR, *et al.* Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. **Circ Res.** 85: 147-53, 1999.
- SIWIK DA, PAGANO PJ, COLLUCI WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol.** 280: 201-10, 2001.
- SNEDECOR GN, COCHRAN WS. Statistical methods. 7ed. Ames Iowa. The Iowa University Press. 505, 1980.

- SPINALE FG, HOLZGREFE HH, MUKHERJEE R, *et al.* Angiotensin converting enzyme inhibition and the progression of congestive cardiomyopathy. **N Engl J Med.** 334: 809-14, 1996.
- STAEISBY WN, BROOKS GA. Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. **Exerc Sport Sci Ver.** 18: 29-63, 1990.
- STRÖMER H, CITTADINI A, DOUGLAS PS, *et al.* Exogenously administered growth hormone and IGF-I alter intracellular  $Ca^{2+}$  handling and enhance cardiac performance: In vivo evaluation in the isolated isovolumic buffer-perfused rat hearts. **Circ Res.** 79: 227-36, 1996.
- THORNER MO, VANCE ML. Growth hormone. **J Clin Invest.** 82: 745-47, 1988.
- TANAKA N, RYOKE T, HONGO M, *et al.* Effect of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. **Am J Physiol.** 275: H393-99, 1998.
- TAJIMA M, WEINBERG EO, BARTUNEK J, *et al.* Treatment with growth hormone enhances contractile reserve and intracellular calcium transients in myocytes from rats with postinfarction heart failure. **Circ.** 99: 127-34, 1999.
- TIMSIT J, RIOU B, BERTHERAT J, *et al.* Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern, and myosin adenosine triphosphatase activity of rat left ventricle. **J Clin Invest.** 86(2): 507-15, 1990.
- TIVESTEN A, BOLLANO E, CAIDAHL K, *et al.* The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. **Endocrinol.** 141: 60-6, 2000.
- TIVESTEN A, CAIDAHL K, KUJACIC V, *et al.* Similar cardiovascular effects of growth hormone and insulin like growth factor-1 in rats after experimental myocardial infarction. **Growth Hormone & IGF Research.** 11: 187-95, 2001.
- UEYAMA T, OHKUSA T, YANO M, *et al.* Growth hormone preserves cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release channel (ryanodine receptors) and enhances cardiac function in cardiomyopathic hamsters. **Cardiovasc Res.** 40: 64-73, 1998.
- ZORNOFF LA, SPADARO J. Ventricular remodeling after acute myocardial infarction. Concepts, pathophysiology and therapeutic approach. **Arq Bras Cardiol.** 68(6):453-60, 1997.
- YANG RH. Growth hormone improves heart function in rats with congestive heart failure. **J Heart Fail.** 1: 793, 1993.
- WILSON JR, MARTIN JL, SCHWARTZ D, *et al.* Exercise intolerance in patients with chronic heart failure: role of impaired nutritive flow to skeletal muscle. **Circ.** 69: 1079-87, 1984.

- WEBER K, KINASEWITZ G, JANICKI J, *et al.* Oxygen utilization and ventilation during exercise in patients with chronic heart failure. **Circ..** 65: 1213-23, 1982.
- WEN-LIENG L. Changes of the Insulin-Like Growth Factor I System during Acute Myocardial Infarction: Implications on Left Ventricular Remodeling. **J Clin Endocrinol Metab.** 84, 1575-81, 1999.