

FÁBIO RODRIGUES FERREIRA SEIVA

*A BIOQUÍMICA DO ENVELHECIMENTO E
OBESIDADE*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

UNESP

Botucatu

2011

FÁBIO RODRIGUES FERREIRA SEIVA

*A BIOQUÍMICA DO ENVELHECIMENTO E
OBESIDADE*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de
Medicina de Botucatu-UNESP, para obtenção do
Título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Seiva, Fábio Rodrigues Ferreira.

A bioquímica do envelhecimento e obesidade / Fábio Rodrigues Ferreira
Seiva. – Botucatu, 2011

Tese (doutorado) – Faculdade Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Capes: 40101002

1. Envelhecimento. 2. Obesidade. 3. Somatotropina.

Palavras-chave: Coração; Envelhecimento; Hormônio do crescimento;
Obesidade.

**ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA DO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS-IB, UNESP, BOTUCATU E NO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA DA FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU – FMB.**

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos meus familiares e amigos, por me permitirem desfrutar de momentos enriquecedores, alegres e inesquecíveis, durante toda minha trajetória.

Agradecimentos

Obrigado,

- Professora Ethel Novelli, pelo apoio, carinho e paciência –

Este trabalho contou com o apoio da **FAPESP** (Fundação de Amparo
a Pesquisa do Estado de São Paulo), e do Laboratório Químico
Farmacêutico Bérigamo Ltda.

INTRODUÇÃO

A BIOQUÍMICA DO ENVELHECIMENTO E OBESIDADE

O presente trabalho teve como objetivos, avaliar o efeito do envelhecimento e da obesidade, induzida por dieta, em parâmetros bioquímicos, morfométricos e enzimáticos em ratos, bem como determinar os efeitos do hormônio de crescimento (GH) nos mesmos.

Para atender aos objetivos propostos o estudo foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo comparar perfis bioquímicos, morfométricos e calorimétricos entre animais jovens, controles e obesos, com animais velhos, controles e obesos, evidenciando desta maneira os efeitos do envelhecimento e da obesidade induzida por dieta.

No segundo capítulo foram avaliados os efeitos do GH em ratos Wistar considerados jovens. Este trabalho foi publicado na revista ***Hormone and Metabolic Research*** (v.42; pag 496-501, 2010)(conceito Capes – A2).

No terceiro capítulo do estudo, foram determinados os efeitos do GH em animais considerados velhos. Este trabalho foi enviado para publicação na revista ***Hormone and Metabolic Research*** (conceito Capes – A2) e está sob revisão para aceite.

Índice

Resumo	01
---------------------	-----------

Capítulo 1:

Introdução	04
------------------	----

Metodologia:

Grupos Experimentais e Dieta	10
Parâmetros Nutricionais	11
Preparo da ração	12
Calorimetria	12
Glicemia e TOTG	13
Avaliação Hormonal	13
Obtenção da amostras e determinações bioquímicas	14
Lipidemia e Lipoproteínas	14
Análise do estresse oxidativo e metabolismo energético.....	15
Análise estatística	17
Resultados	18
Figuras e Tabelas	21
Discussão	31
Referências	42

Capítulo 2:

Resumo	48
Artigo	53

Capítulo 3:

Resumo	55
Artigo	59

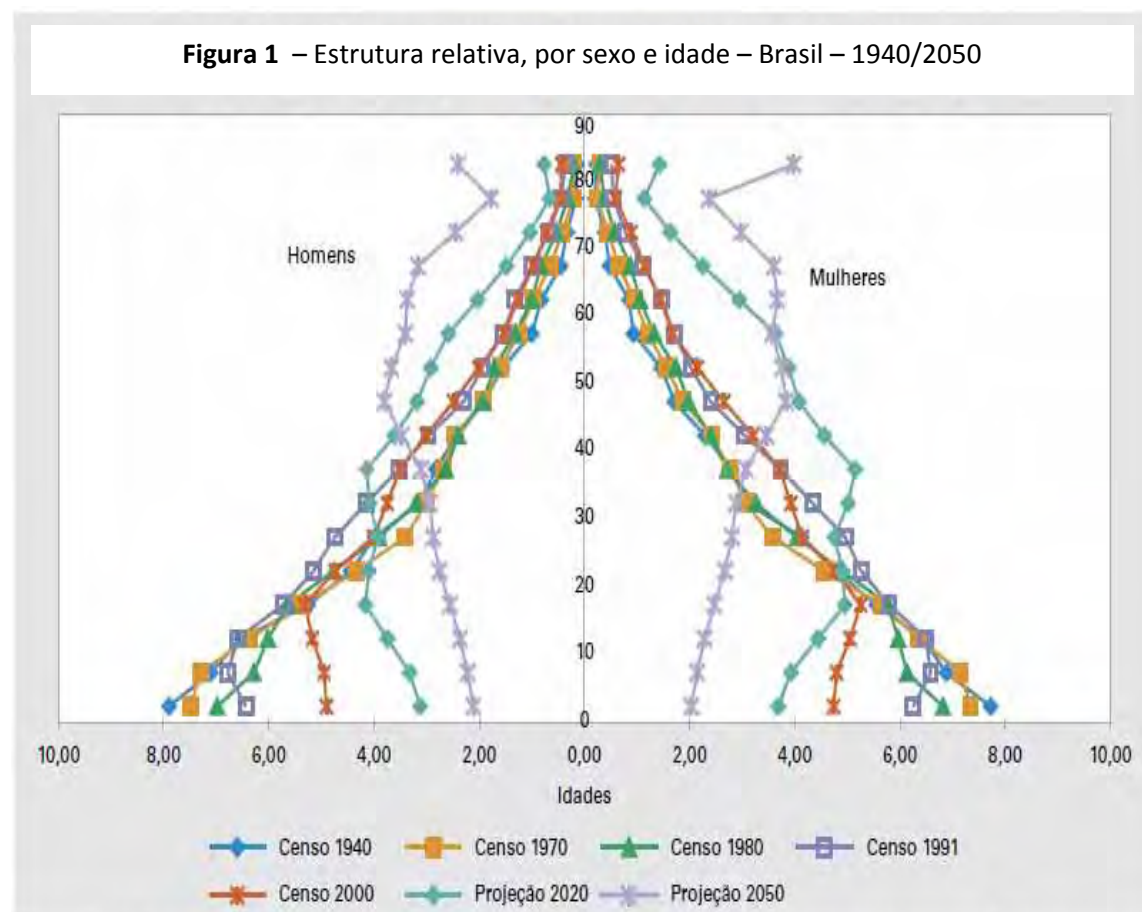
CAPÍTULO 1

**EFEITOS DO ENVELHECIMENTO, EM RATOS
WISTAR CONTROLES E OBESOS, EM PARÂMETROS
CALORIMÉTRICOS, PERFÍL LIPÍDICO, ESTRESSE
OXIDATIVO, GLICEMIA E METABOLISMO
ENERGÉTICO CARDÍACO.**

INTRODUÇÃO.

O envelhecimento deve ser entendido como um processo biológico natural e inevitável, que ocorre em todos os organismos vivos. Na espécie humana ainda muito se discute o “quando” uma pessoa é considerada idosa. Segundo a OMS, 60 ou 65 anos, ou mais, é a idade adotada, na maioria dos países desenvolvidos, para a pessoa ser considerada como idosa (GORMAN, 1999). Embora um consenso ainda esteja longe de ser admitido, é evidente que a população humana vem experimentando um aumento considerável de indivíduos com idade avançada. O gráfico abaixo mostra dados relativos ao aumento de pessoas com mais de 60 anos no decorrer das décadas. A estimativa é que para os anos seguintes, esse aumento se torne ainda mais perceptível.

Figura 1 – Estrutura relativa, por sexo e idade – Brasil – 1940/2050



Fontes: IBGE, Censo Demográfico 1940/2000 e Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade para o Período 1980-2050 – Revisão 2008.

Mais importante do que pessoas viverem mais é pessoas viverem mais e melhor. Para tanto muito esforço tem sido feito no que se refere à prevenção e/ou tratamento de problemas de saúde que acompanham o avançar da idade.

Há várias teorias que propõem explicar o envelhecimento, que de uma forma geral podem ser agrupadas em “teorias de programação” (teoria do relógio biológico, teoria do número limitado de proliferação celular) e “teorias de erros” (teoria das patologias, teoria dos radicais livres, teoria das taxas metabólicas) ou mesmo uma combinação das duas (MEDVEDEV 1990; SEMSEI 2000; WEINERT & TIMIRAS 2003; VIÑA et al., 2007). O papel do metabolismo no envelhecimento é explicado pela teoria das taxas metabólicas, que sugere que animais com uma elevada taxa metabólica, apresentam menor expectativa de vida. A teoria, mundialmente discutida, dos radicais livres leva em conta a taxa metabólica e o envelhecimento (DESAI et al., 2010). Sabe-se que as mudanças na composição corporal são devido às alterações no balanço energético, com o balanço positivo levando ao ganho de peso e com o balanço negativo, levando a perda de peso. Durante o envelhecimento tende a ocorrer uma diminuição no gasto energético, o que poderia contar para o desenvolvimento da obesidade (ST-ONGE, 2010). A geração de compostos químicos reativos, que advêm de processos fisiológicos e que se acumulam com o tempo, perfaz o ponto de ligação entre o envelhecimento e as espécies reativas do oxigênio (EROs).

EROs ou radicais livres (RL) são moléculas altamente reativas por apresentarem um número ímpar de elétrons no seu orbital. Esses compostos podem reagir com vários componentes celulares, como proteínas, lipídios, DNA e outras biomoléculas, alterando suas estruturas e funções. Os organismos contam com sistemas de defesa contra a ação nociva desses RLs. Sistemas enzimáticos, superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) e redutase (GSH-Rd), e não enzimáticos, glutathione, ascorbato, melatonina, bilirrubina, tocoferol e carotenóides,

contrabalanceiam os danos causados pelos RLs (GILCA et al., 2007). O desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, com elevação dos sistemas oxidantes é chamado estresse oxidativo (EO) (DESAI; WU, 2008). A interrelação entre EO e metabolismo é que grande parte da geração de RLs ocorre fisiologicamente em processos fundamentais para o organismo, tais como, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, reação de Fenton não mitocondrial, síntese de óxido nítrico, citocromo P450 microsomal, β -oxidação, “burst” respiratório das células fagocitárias, entre outros (GILCA et al., 2007). Desta maneira torna-se praticamente impossível dissociar a geração de RLs com o desenvolvimento natural de um ser vivo.

Dentre os problemas de saúde que acometem os idosos, problemas cardiovasculares são disparados os mais freqüentes, sendo a insuficiência cardíaca (IC) o estágio final comum que eleva o número de óbitos e comorbidades nesta população (JUGDUTT et al., 2010).

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), sendo portanto suscetível a sofrer vários tipos de injúria que poderão levar a IC (Figura 1).

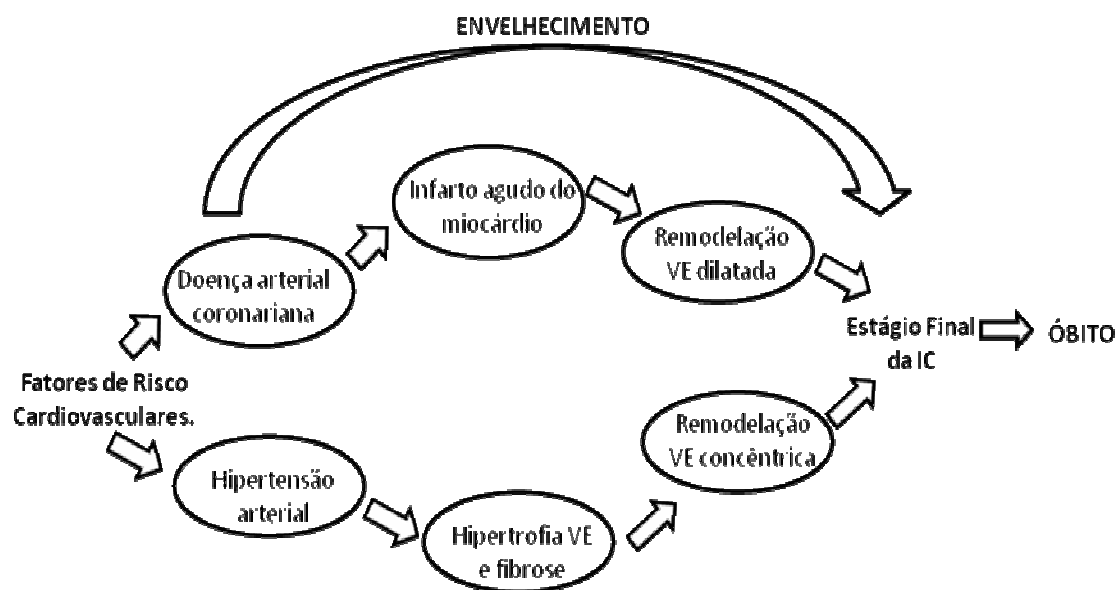


Figura 2. Evolução da insuficiência cardíaca que acompanha o envelhecimento. Insuficiência cardíaca (IC) é considerada uma doença progressiva que contribui para o aumento da mortalidade e comorbidades em indivíduos idosos. VE – ventricular esquerda. *Adaptado de Jugdutt, 2010.*

Dentre os fatores de risco para doenças cardiovasculares, tanto a idade como a obesidade são importantes contribuintes para a progressão da doença (Tabela 1).

Tabela 1 – Fatores de risco para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares mais comuns. * Fatores importantes para a progressão da IC.

Fatores de Risco
Idade *
Fatores Genéticos
Dieta
Tabagismo
Sedentarismo
Stress*
Dislipidemia
Diabetes Tipo 2*
Obesidade*
Síndrome Metabólica
Hipertensão*

Adaptado de Jugdutt, 2010.

A obesidade pode ser definida como um dano multifatorial que se desenvolve através da associação entre fatores genéticos e ambientais. Entretanto, o rápido aumento na sua incidência tem sugerido que o estilo de vida constitui o principal fator para a ocorrência da obesidade. Estimativas da organização mundial da saúde são de que para o ano de 2015, aproximadamente 2.3 bilhões de pessoas apresentem sobrepeso e haja mais de 700 milhões de obesos no mundo (WHO, 1998). Embora o fator genético seja um importante parâmetro a ser levado em conta, está cada vez mais claro que, os hábitos alimentares, bem como a diminuição das atividades físicas, sejam fatores relevantes a serem considerados (ASTRUP et al,1994; LISSNER,1995). Em ratos jovens, quando a energia ingerida excede as necessidades básicas do organismo, a taxa metabólica tende a aumentar de forma a regular o gasto energético,

liberando energia excedente na forma de calor (IOSSA et, 1995, 1997), entretanto, tanto em humanos quanto em roedores, este controle se perde levando a um aumento da gordura corporal e a obesidade no avançar da idade (BARZILAI; ROSSETI, 1995; IOSSA et al, 2003). Esse descontrole metabólico fica claro quando se observa que mesmo animais velhos recebendo dieta com baixa quantidade de ácidos graxos, tendem à obesidade (BARZILAI; ROSSETTI 1995). Estudos apontam para uma relação entre maior risco cardiovascular e aumento da gordura corporal (total, subcutânea ou visceral) (REXRODE et al, 1998; BAIK et al, 2000; ATTALLAH et al, 2006).

O tipo de dieta ocidental, rica em açúcar e gordura, vem contribuindo muito para o aumento da obesidade ao redor do mundo. O aumento de lipídios circulantes eleva os riscos para problemas associados à obesidade, tais como, diabetes tipo 2, hipertensão, síndrome metabólica, entre outros. Desta forma fica evidente a associação entre envelhecimento e obesidade, na qual ambos os processos compartilham características semelhantes e que muitas vezes se sobrepõem. O objetivo deste trabalho foi, portanto, determinar parâmetros calorimétricos, morfométricos e relacionados com o metabolismo energético cardíaco em animais considerados jovens e velhos, obesos e controles, e desta forma elucidar possíveis consequências da obesidade e envelhecimento nos fatores de risco cardiovasculares.

METODOLOGIA

• ANIMAIS E DIETA

O procedimento experimental foi aprovado pelo comitê de Ética na Experimentação Animal, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu.

Foram utilizados 64 ratos machos *Wistar*, sendo 32 ratos adultos jovens de 75 dias de idade e 32 ratos com idade avançada de 510 dias de idade (CASTILLO et al., 2005). Os animais eram provenientes do Biotério Central da UNESP “Campus de Botucatu” e foram transferidos para o “Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal”, do Departamento de Química e Bioquímica, IB, UNESP, Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais recebendo dieta padrão

• GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais de cada faixa etária foram divididos em 2 grupos (n=8).

GRUPO COM RATOS JOVENS

JC – animais considerados jovens, mantidos com ração padrão e água *ad libitum*.

JH- animais considerados jovens, mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol e solução aquosa de sacarose 30% na água de beber *ad libitum*.

O grupo JC, considerado controle, recebeu ração padrão (Biobase, 9301, SIF nº SC – 25035, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais do grupo JH, foram mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol e receberam solução aquosa de sacarose 30% na água de beber, para

induzir obesidade. Esta dieta foi mantida até o fim do experimento. O período total de experimento foi de 75 dias.

GRUPO COM RATOS DE IDADE AVANÇADA

VC – animais considerados velhos, mantidos com ração padrão e água *ad libitum*.

VH- animais considerados velhos, mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol e solução aquosa de sacarose 30% na água de beber *ad libitum*.

O grupo velho (V) VC, considerado controle, recebeu ração padrão (Biobase, 9301, SIF nº SC – 25035, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais do grupo VH, foram mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol e receberam solução aquosa de sacarose 30% na água de beber, para induzir obesidade. Esta dieta foi mantida até o fim do experimento. O período total de experimento foi de 75 dias.

• PARÂMETROS NUTRICIONAIS

A ingestão alimentar foi controlada diariamente, no mesmo horário (9:00 as 11:00 horas). Foi oferecida uma quantidade conhecida de ração. Após o período de 24 horas o restante foi pesado, permitindo a determinação do consumo alimentar de cada animal de cada grupo. O consumo de água e de soluções de sacarose ingeridas por animal, foi determinado a cada 3 dias, podendo-se quantificar a água e soluções de sacarose por dia, por animal. O peso corporal foi determinado semanalmente.

Com base na energia ingerida e o peso corporal foi calculada a eficiência alimentar (EA) (%) = (ganho de peso/energia ingerida) x 100 (NOVELLI et al., 2002; DINIZ et al., 2005) .

- **PREPARO DAS RAÇÕES**

Para indução de obesidade foi preparada ração com elevada concentração de colesterol e sacarose. Esta foi obtida pela trituração do farelo da ração padrão (Biobase, 9301, SIF n° SC – 25035, Brasil) até formação de farelo homogêneo. A seguir, foram adicionados para cada 1000g do farelo da ração 12,33g de colesterol cristalino, 1,23g de ácido cólico (COSTA, et. al., 1993), 131,01g de sacarose e 84,77mL de óleo de soja (REEVES, 1997; QUILES et al., 2003). A mistura foi homogeneizada com 230mL de água quente (inferior a 60°C), e colocada em máquina específica para formação de "pellets". Estes foram secos em estufa com ar circulante por um período de 24h, em temperatura inferior a 70°C. Após secos, a ração foi deixada à temperatura ambiente para esfriar durante 24h, e conservada em câmara fria a 6°C. A validade da ração preparada era de 3 meses. A dieta rica em colesterol e sacarose utilizada apresentava 3,64 Kcal/g de energia metabolizável, sendo 0,61Kcal/g proveniente de proteínas, 1,06Kcal/g de lipídios e 1,73Kcal/g de carboidratos, comparada com a dieta padrão que apresentava 3,00Kcal/g sendo 0,79Kcal/g proveniente de proteínas, 0,39Kcal/g de lipídios e 1,57Kcal/g de carboidratos.

- **CALORIMETRIA: METABOLISMO BASAL E UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATO ENERGÉTICO**

Após 70 dias de período experimental, foi realizada a calorimetria indireta nos animais em condição de jejum de 12h, para que no momento da determinação o glicogênio muscular e hepático tenha sido depletado (COMMERFORD et al., 2000). Foi utilizada câmara metabólica para sistema respiratório animal (CWE, Inc, St. Paul, USA), com medidas obtidas através de programa específico (software MMX, CWE, Inc., USA). Após adaptação dos animais à câmara metabólica durante 7 dias, 10

minutos/dia, cada animal foi colocado na câmara metabólica permanecendo durante 10 minutos em repouso com fluxo de ar constante.

Foram determinados o metabolismo basal, o consumo de O_2 (VO_2) e a produção de CO_2 (VCO_2). A oxidação de carboidratos e de lipídios foi calculada tendo como base o quociente respiratório ($QR = VCO_2/VO_2$) (STROHL et al., 1997), bem como os volumes de oxigênio consumido (LABAYEN et al., 1999): *Oxidação de carboidrato* = $VO_2 \times (RQ - 0.707)/0.293 \times 0.746$; *Oxidação de lipídio* = $VO_2 \times (1 - RQ)/0.293 \times 0.746$. Onde VO_2 é medido em l/min, 1,00 é o QR para a oxidação total de carboidrato, 0,707 é o QR para a oxidação total de lipídios, 0,293 é a diferença entre 1,000 e 0,707, 0,746 é o numero de litros de oxigênio consumido por g de glicose oxidada.

- **DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA E DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE**

A glicemia foi determinada após 60 dias de tratamento com os animais em jejum (12h), através do glicosímetro Boehringer Mannheim, Eli Lilly, SP, Brasil. Ao final do experimento, após 75 dias de período experimental, foi realizado o teste oral de tolerância a glicose (TOTG). Para tanto foram determinadas a glicemia de jejum (12-14 horas), e de 30, 60 e 120 minutos após administração de solução aquosa de glicose 20% (2g/Kg) pela via oral (intra-gástrica).

- **AVALIAÇÃO HORMONAL**

Com o objetivo de avaliar o status hormonal, relacionado ao eixo GH/IGF-I, após 75 dias de período experimental, foram dosadas as concentrações séricas de IGF-1, a partir do sangue coletado pela veia caudal, nos grupos experimentais. As dosagens

foram feitas no mesmo ensaio, empregando-se a metodologia de ELISA (rat/mouse IGF-I ELISA), IDS AC18F1 – Immunodiagnostic Systems Ltd).

- **OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS, DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**

Após 75 de experimento e após o TOTG, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 3%, 0,1mL, i.p.) para realização das análises morfométricas, que incluíram a circunferência abdominal, bem como o comprimento corporal total (exceto cauda). Foi calculado o índice de massa corporal (IMC) (g/cm^2) = peso corporal/comprimento corporal² e o índice de Lee (g/cm) = raiz cúbica do peso corporal/ comprimento corporal (BERNARDIS, 1970).

Os animais foram a seguir, eutanaziados por decapitação. Foram quantificados os depósitos de gordura visceral, epididimal e retroperitoneal, fornecendo assim o índice de adiposidade (IA):

$$\text{IA (\%)} = \text{Gordura Total/Peso Corporal} \times 100 \text{ (WOODS et al., 2003).}$$

- **LIPIDEMIA E LIPOPROTEÍNAS**

Triacilgliceróis foram determinados enzimaticamente na presença de lipase lipoproteica, glicerolquinase, glicerol fosfato oxidase, ATP e peróxido de hidrogênio (MOURA, 1982). A LDL-colesterol foi obtida segundo cálculo de Friedewald et al. (1972). O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colestrol oxidase (MOURA, 1982) com hidrólise enzimática prévia dos ésteres, mediante uma lipase. As lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) são precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstico. No sobrenadante ficam as HDL determinadas pelo colesterol ligado a elas (LOPES VIRELLA et al., 1977).

- **ANÁLISES MIOCÁRDICAS**

O coração foi imediatamente retirado, lavado em solução salina gelada (NaCl 0.9%) e o ventrículo esquerdo (VE) retirado, sendo separadas amostras de 200mg de cada VE, as quais foram armazenadas em freezer a -86°C , para utilização posterior.

A determinação do glicogênio miocárdico foi realizada após homogeneização de amostras de 200mg do VE, em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,4 (200mg/5mL) em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm e o sobrenadante utilizado para determinação da glicose livre. Após tratamento com 3.5 U de amiloglicosidase, foi determinada a concentração de glicose liberada. A concentração de glicogênio foi obtida subtraindo-se as concentrações de glicose livre das respectivas concentrações de glicose liberadas (Roehrig & Allred, 1974). Também foi determinada a concentração de triacilglicerol no tecido cardíaco (BLIGH; DYER, 1959).

- **ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO METABOLISMO ENERGÉTICO**

Para determinação de marcadores do estresse oxidativo (EO) amostras de 200mg do VE foram 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 10.000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C , sendo os sobrenadantes utilizados para as determinações de proteínas totais (LOWRY et al., 1951), marcadores do estresse oxidativo (Jiang et al., 1991) e enzimas reguladoras das vias metabólicas.

A análise do estresse oxidativo foi realizada através da quantificação da lipoperoxidação, determinada através do método do hidroperóxido de lipídio, o qual mede uma das fases da oxidação de ácidos graxos (AVIRAM; EIAS, 1993; PARFITT et

al., 1994). O hidroperóxido foi determinado através da oxidação do ferro (Fe^{2+} , sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido a 560nm (Jiang et al., 1991). A porcentagem de SAT foi calculada através da inibição de formação de hidroperóxido de lipídio (MEHMETCIK et al., 1997).

O metabolismo energético foi analisado através das enzimas reguladoras das vias metabólicas (Figura 3), fosfofruto quinase (PFK, E.C.2.7.1.11.) e lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27.) associadas à glicólise e ao metabolismo anaeróbico respectivamente; complexo piruvato desidrogenase (Pi-DH), importante reguladora do metabolismo miocárdico e citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7.), reguladora do fluxo de metabólitos através do Ciclo de Krebs e marcadora do metabolismo aeróbico.

A PFK foi determinada na presença de aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose-fosfato isomerase, ATP (adenosina trifosfato) e frutose-6-fosfato, sendo quantificada pela oxidação do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) (BASS et al., 1969).

A atividade da LDH foi quantificada pela velocidade de oxidação do NADH, medida a 340 nm, tendo como substrato o piruvato (BASS et al., 1969).

A CS foi quantificada em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo acetil-CoA 0,1 mM, dithiobis-2-nitrobenzoato 0,1 mM (DTNB) e oxaloacetato 0,5 mM (Bass et al., 1969).

A velocidade de conversão do piruvato em acetil CoA catalisada pelo complexo enzimático Pi-DH foi determinada pela redução do NAD na presença de tiamina pirofosfato, coenzima A (CoA) e piruvato, em tampão fosfato de potássio (HINMAN; BLASS, 1981).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com controle de temperatura (UV/visível Ultrospec 5,000 com Swift II software, Cambridge, England, UK) e em

leitor de microplaca (μQuant-MQX 200 Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle através do software Kcjunior (Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

• FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância para dois fatores, dieta e idade, (Two-Way - ANOVA). Para os valores significantes, o teste de Tukey-post hoc foi utilizado para comparação entre grupos. O nível de significância adotado foi de 5%.

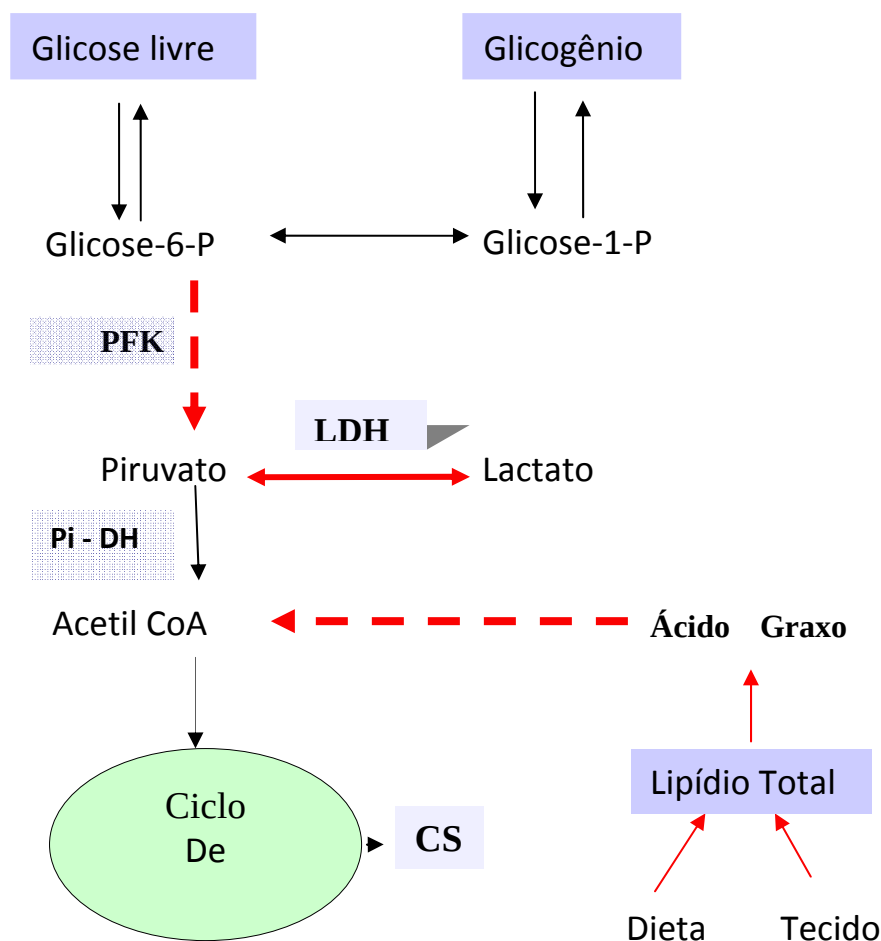


Figura 3. Esquema mostrando as principais enzimas reguladoras do metabolismo energético cardíaco.

• RESULTADOS.

A Figura 4 representa a evolução do peso corporal nos quatro grupos em questão. Animais com 510 dias (velhos) apresentaram peso inicial maior que seus respectivos controles jovens. Por volta da sexta semana de experimento, animais jovens que receberam dieta hipercalórica tiveram peso maior comparado com o grupo JC, entretanto essa diferença não foi vista ao final do período experimental. Os grupos JC, JH e VH tiveram peso final maior que o inicial. O grupo VH teve peso final mais elevado que o do grupo VC.

Animais do grupo JH tiveram, em relação ao grupo JC, maior circunferência abdominal, IMC e índice de Lee. O mesmo ocorreu com o grupo VH comparado com o grupo VC. O grupo VC apresentou maior comprimento total que o seu controle jovem. Animais que receberam dieta hipercalórica, independente da idade, consumiram menos ração e animais com idade avançada consumiram menos ração hipercalórica que os animais jovens (Tabela 2).

Na Tabela 3 estão representadas as concentrações séricas de IGF-I, glicemia e triacilglicerol (TG). Animais que receberam dieta hipercalórica mostraram elevadas concentrações de IGF-I, comparadas com os animais que receberam dieta controle. A glicemia foi maior apenas no grupo VH, comparado com os grupos JH e VC. As concentrações de TG aumentaram após 75 dias de consumo de dieta hipercalórica. O grupo VH, após esse período apresentou maior concentração de TG que o grupo JH.

Os dados referentes à calorimetria indireta estão mostrados na Tabela 4. Animais do grupo JH tiveram diminuídas as relações taxa metabólica de repouso/peso corporal (TMR/PC), VO_2 /superfície corporal (SC) e a oxidação de carboidratos, comparados ao grupo JC. Animais com idade avançada do grupo C tiveram maiores valores, comparados ao grupo JC, na VO_2 /SC e oxidação de lipídios e redução da TMR/PC. Já o grupo VH apresentou diminuição da TMR/PC e aumento da VO_2 /SC,

comparado com o grupo JH. A oxidação de lipídios e a relação VCO_2/PC foi menor no grupo VH comparado ao grupo VC.

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) está apresentado na Figura 5. O grupo JC teve aumento da glicemia após a carga de glicose e esses valores se aproximaram do normal após 120 minutos. O mesmo comportamento ocorreu no grupo JH. Entretanto após 120 minutos, no grupo JH, a glicemia foi maior que a observada no estado basal e maior que a observada no grupo JC. Os dois grupos com idade avançada tiveram, após a carga de glicose, um aumento significativamente maior que os grupos jovens, e a glicemia nesses animais permaneceu elevada mesmo após os 120 minutos pós-prandial.

Na Figura 6 estão mostradas as concentrações de triacilglicerol, colesterol total bem como suas frações, LDL, VLDL e LDL. O grupo VH apresentou elevação da concentração de TG, em relação a dos grupos JH e VC. A concentração de colesterol total foi mais elevada no grupo JH comparado ao JC, assim como no grupo VH comparado aos grupos JC e VH. As frações HDL, VLDL e LDL do grupo VH foram superiores às encontradas no grupo JH e, os animais jovens que receberam dieta hipercalórica tiveram aumento da fração LDL comparados aos jovens que receberam dieta padrão.

Os dados referentes aos depósitos de gordura estão mostrados na Figura 7. O grupo JH teve maior acúmulo de gordura visceral, epididimal, retroperitoneal e total comparado ao seu controle. De maneira semelhante, o grupo VH apresentou aumento nos depósitos de gordura, comparado com o seu controle.

A concentração de HP, SAT bem como o índice aterogênico estão mostrados na Figura 8. Animais do grupo JH tiveram maiores valores para o HP e IA, comparado ao seu grupo controle. Já o grupo VC, comparado ao grupo JC, apresentou menor concentração de HP e SAT. O grupo com idade avançada e que recebeu DH, teve

maiores concentrações de HP, porcentagem de SAT e IA, comparado ao grupo VC, e menor porcentagem de IA, comparado ao grupo JH.

Na figura 9 estão representadas as quantidades de glicogênio cardíaco. O grupo JH, que apresentou redução dos estoques de glicogênio e o grupo VH apresentou elevação do mesmo, quando comparados aos seus grupos controles.

Na Tabela 5 estão os resultados das atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo energético cardíaco. O consumo de dieta H no grupo J diminuiu a atividade da PKF e aumentou a da Pi-DH. Quando comparados os grupo JC e VC, o último apresentou diminuição da concentração de proteína, da atividade das enzimas PFK, Pi-DH e aumento da citrato sintase e lactato desidrogenase. Quando comparados os grupos com idade avançada entre si, animais do grupo VH tiveram menor quantidade de proteína, atividade da PKF e Pi-DH, bem como aumento da citrato sintase e lactato desidrogenase. O grupo VH também apresentou maior atividade da Pi-DH, comparado ao grupo VC.

- **FIGURAS E TABELAS.**

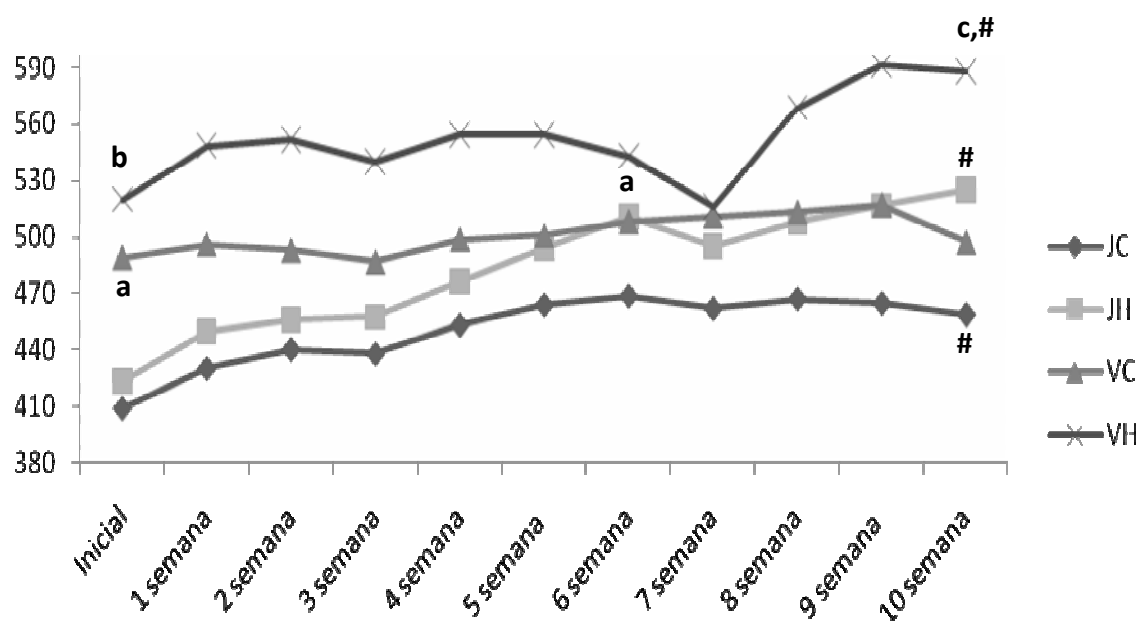


Figura 4. Evolução do peso corporal nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH). Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC; # Diferença entre peso inicial e final.

Tabela 2. Parâmetros nutricionais e morfométricos nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).

PARÂMETROS	GRUPOS			
	JC	JH	VC	VH
Consumo de ração (g/dia)	25,62±8,14	8,75±2,18 ^a	36,62±1,92 ^b	14,50±5,20 ^{b,c}
Consumo Líquido (ml/dia)	60,62±7,76	60,00±10,69	46,5±5,78 ^{a,b}	55,62±8,63 ^b
Comprimento Total (cm)	25,56±0,90	25,56±0,90	27,42±0,97 ^a	26,42±0,97
Circunferência abdominal (cm)	18,0±1,10	19,62±1,88 ^a	17,28±0,48	20,42±0,78 ^c
IMC (g/cm ²)	0,70±0,04	0,83±0,07 ^a	0,64±0,02	0,80±0,08 ^c
Índice de Lee (g/cm)	6,04±0,40	7,23±0,68 ^a	5,86±0,32	7,13±0,85 ^c

IMC: Índice de massa corporal. Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC.

Tabela 3. Concentração de hormônio de crescimento insulina-símile (IGF-1), glicemia, triacilglicerol (TG) nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).

PARÂMETROS	GRUPOS			
	JC	JH	VC	VH
IGF -1 (ng/ml)	988,9890,25	1448,27±222,32 ^a	983,35±81,75	1358,28±220,23 ^c
Glicemia (mg/dl)	68,5±8,91	71,25±7,40	75,5±5,20	96,71±4,38 ^{b,c}
TG (mg/dl)	98,8±15,15 [#]	175,16±22,58 ^a	103,71±7,06	297,71±87,7 ^{b,c}
75 dias				

Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC.

Tabela 4. Parâmetros calorimétricos em animais dos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).

Parâmetros	GRUPOS			
	JC	JH	VC	VH
QR	0,70±0,22	0,68±0,12	0,59±0,15	0,58±0,07
TMR/PC (kcal/h/g)	2,10±0,56	1,74±0,26 ^a	1,18±0,23 ^a	1,15±0,14 ^b
VO ₂ /PC (ml/h/g)	0,46±0,14	0,38±0,07	0,52±0,12	0,43±0,06
VCO ₂ /PC (ml/h/g)	0,29±0,03	0,25±0,001	0,29±0,01	0,24±0,001 ^b
VO ₂ /SC (ml/h/g)	2,91±1,02	2,53±0,51 ^a	3,34±0,79 ^a	2,90±0,39 ^b
Oxidação CHO (mg/min.)	1,07±0,61	Não detectável ^a	Não detectável ^a	Não detectável
Oxidação Lipídio (mg/min.)	4,47±2,55	3,05±1,81	5,05±2,70 ^a	4,56±1,40 ^c

QR: Quociente respiratório; TMR: Taxa metabólica em repouso; PC: peso corporal; SC: superfície corporal; CHO: carboidrato. Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC.

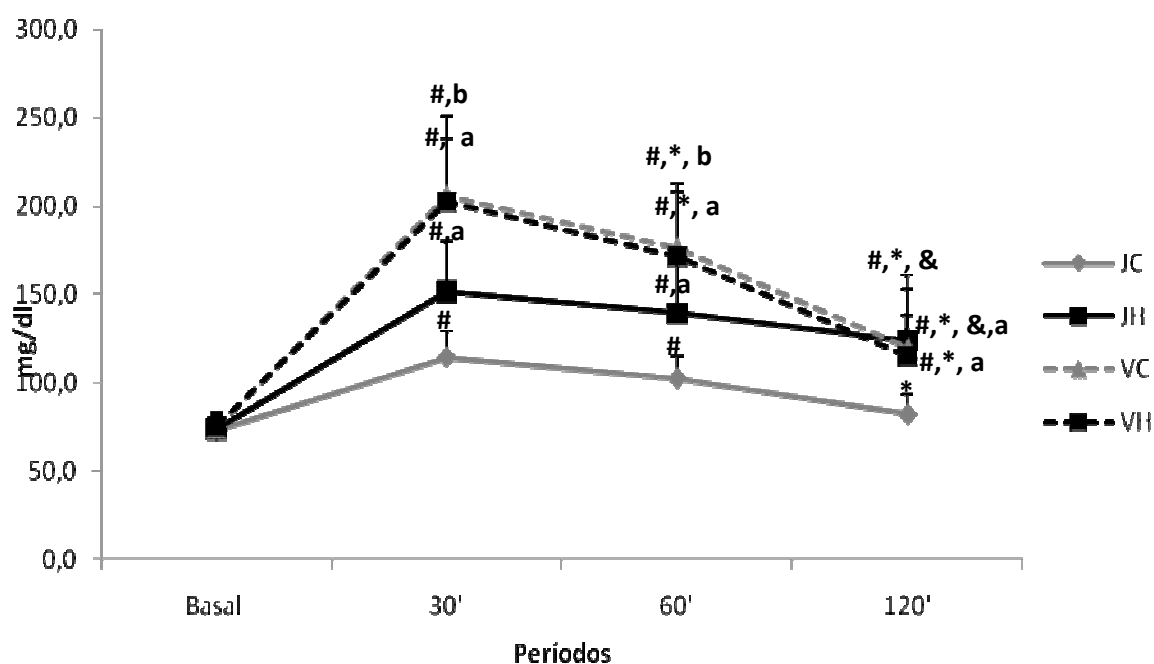


Figura 5. Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG) nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH). Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; Símbolos: # - difere significativamente do período Basal; * - difere significativamente do período 30'; & - difere significativamente do período 60'.

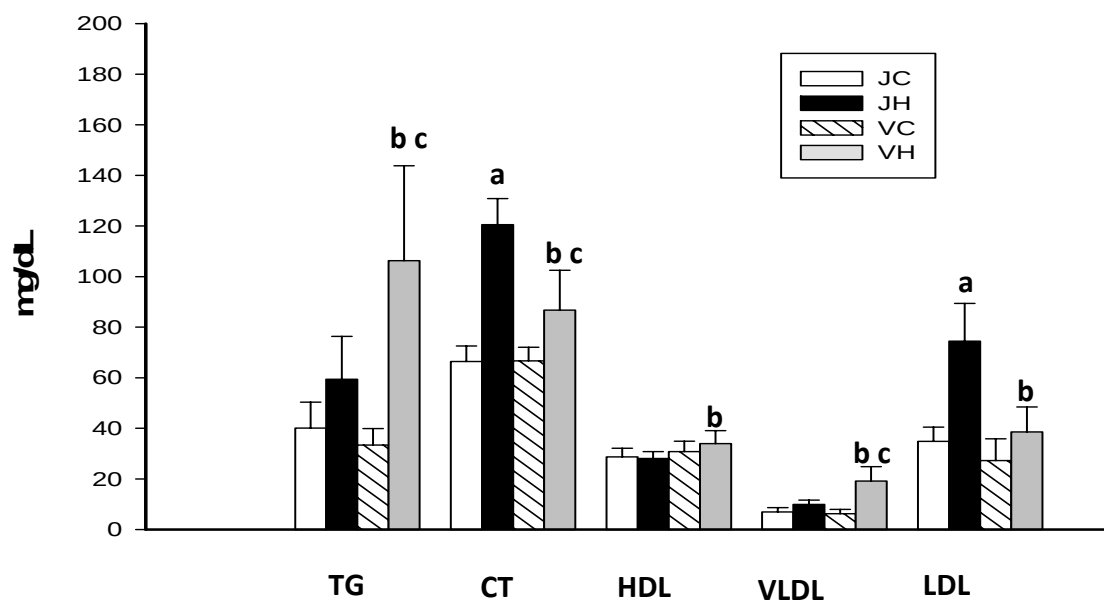


Figura 6. Lipidemia nos animais dos grupos: Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH). TG – triacilglicerol; CT – Colesterol total; HDL – Lipoproteína de alta densidade; VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade; LDL – Lipoproteína de baixa densidade. Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC.

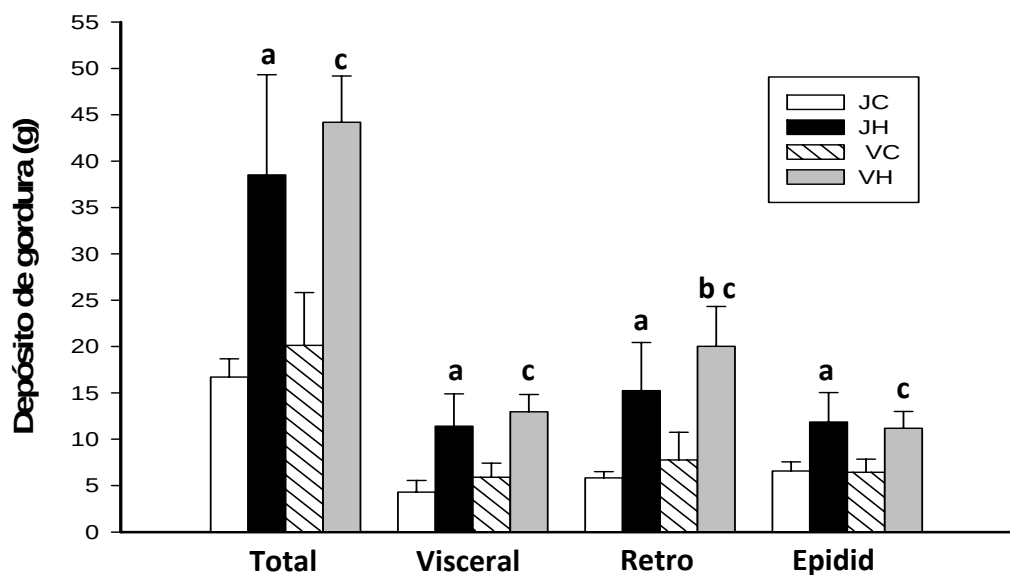


Figura 7. Quantidade de gordura total, visceral, retroperitoneal e epididimal nos animais dos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).

Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC.

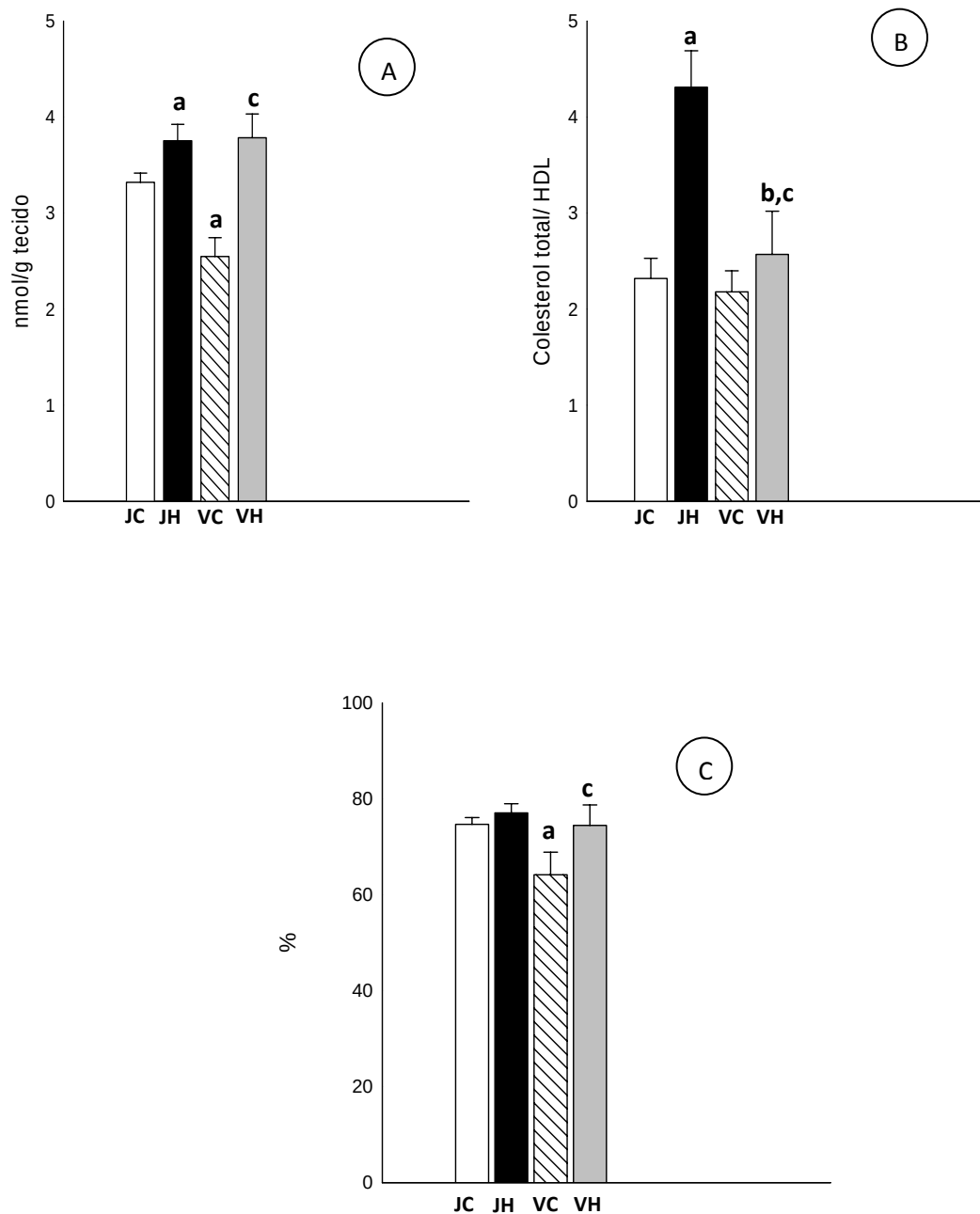


Figura 8. A - Concentração de hidroperóxido de lipídio miocárdico (HP). B - Índice aterogênico. C - Porcentagem de substâncias antioxidantes totais (SAT), nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).
Letras: a - difere significativamente do grupo JC; b - difere significativamente do grupo JH;

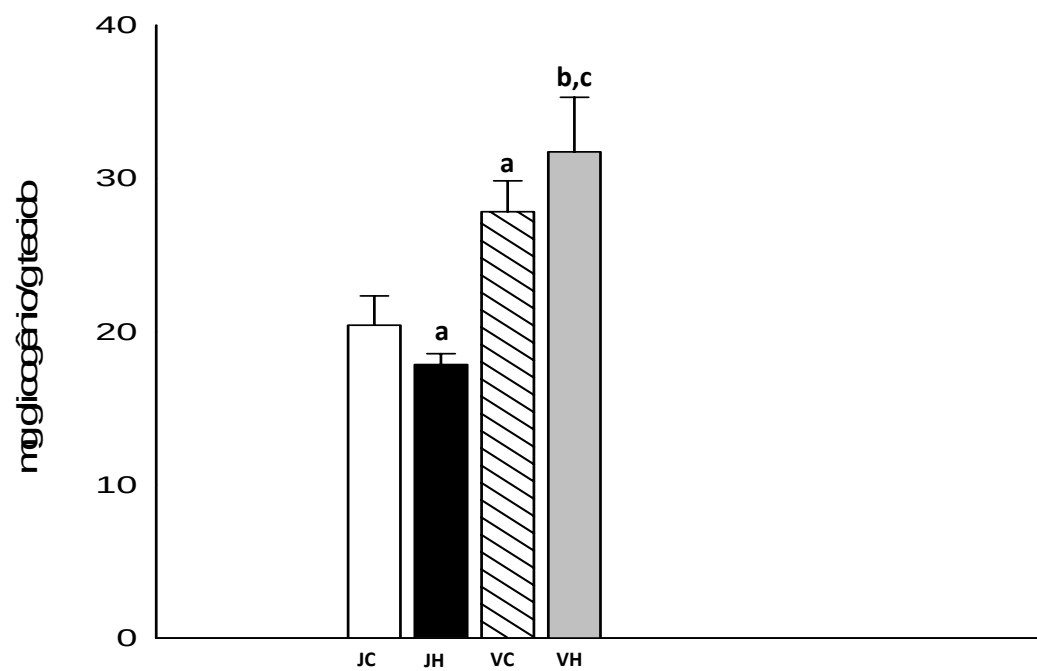


Figura 9. Concentração de glicogênio miocárdico (mg/g de tecido) nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).

Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH;

Tabela 5. Atividade das enzimas metabólicas miocárdicas e proteína miocárdica nos grupos Jovem Controle (JC), Jovem Hipercalórico (JH), Velho Controle (VC) e Velho Hipercalórico (VH).

PARÂMETROS	GRUPOS			
	JC	JH	VC	VH
Proteína (%)	19,66±0,57	20,25±1,02	16,94±2,62 ^a	15,50±1,00 ^b
CS (nmol/mg proteína)	163,76±25,23	171,13±21,62	408,18±44,00 ^a	446,10±57,05 ^b
LDH (nmol/mg proteína)	646,27±41,69	715,70±66,31	1406,5±166,26 ^a	1441,8±345,36 ^b
PFK (nmol/mg proteína)	1,67±0,19	1,46±0,13 ^a	0,13±0,02 ^a	0,16±0,02 ^b
Pi-DH (nmol/mg proteína)	1,07±0,08	1,41±0,21 ^a	0,38±0,18 ^a	0,98±0,30 ^{b c}

CS – Citrato Sintase, LDH – Lactato desidrogenase, PFK – fosfofrutoquinase e Pi-DH – piruvato desidrogenase. Letras: a – difere significativamente do grupo JC; b – difere significativamente do grupo JH; c – difere significativamente do grupo VC.

• DISCUSSÃO

Tanto a obesidade quanto o envelhecimento são fatos indiscutíveis da vida moderna. Por um lado, políticas de saúde pública mais bem planejadas, melhorias nos atendimentos das redes de hospitais bem como fatores sociais que possibilitam um melhor estilo de vida, vêm contribuindo para o aumento da expectativa de vida, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento. Por outro lado, a exigência cada vez maior de jornadas de trabalho, bem como a alta competição existente no mundo moderno, vem contribuindo para o consumo de dietas (rápidas) desbalanceadas, ricas em açúcares e gorduras, elevando desta maneira, o número de pessoas com sobre-peso e/ou obesidade ao redor do mundo.

Este trabalho visou determinar parâmetros calorimétricos, morfométricos e relacionados com o metabolismo energético cardíaco em animais considerados jovens e velhos, obesos e controles, e desta forma elucidar possíveis conseqüências da obesidade e envelhecimento nos fatores de risco cardiovasculares.

Animais do grupo JC, ao final do experimento, apresentaram PC superior ao PC inicial, o que não ocorreu nos animais do grupo VC. Este fato indicou que em animais jovens fatores metabólicos como a taxa metabólica de repouso (TMR) pode contribuir para o controle do ganho de peso. O quociente respiratório (QR) tende a diminuir com o avançar da idade (RIZZO et al, 2005). Embora alguns trabalhos apontem para alterações metabólicas que acompanham o envelhecimento, sem necessariamente, alteração no peso corporal (PC) (ST-ONGE, 2005) neste estudo, animais velhos, apresentaram maior peso corporal que os animais jovens (Fig. 4). Este fato pode estar associado à menor TMR encontrada nos animais com 510 dias (Tabela 4). A TMR traduz a quantidade de energia necessária para a manutenção de órgãos vitais e a redução dessa taxa indica que menos energia é gasta e com isso mais energia permanece disponível para ser armazenada. Alguns trabalhos corroboram esse

achado, demonstrando redução da TMR com o avançar da idade (IOSSA et, 1999; KREMS et al, 2005; FRISARD et al, 2007).

A análise dos animais que receberam dieta hipercalórica (DH) permitiu evidenciar o aumento do PC final em ambos os grupos, J e V (Fig.4). O ganho de peso pode ser visto não apenas como consequência de um balanço energético positivo, mas também como o mecanismo por meio do qual a energia proveniente dos substratos energéticos é metabolizada e estocada. (WILSON-FRITCH et al., 2004). De fato, a conversão de carboidratos em lipídios é um processo anabólico que só ocorre após reposição dos estoques teciduais de glicogênio, indicando que mais energia é necessária para o ganho de peso a partir de carboidratos que a partir de lipídios (ASTRUP; RABEN, 2000, JÉQUIER, 2002). Portanto, diferenças nos componentes da dieta desempenham importante papel na regulação do peso corporal e na patogênese da obesidade, desde que utilizam diferentes vias metabólicas para liberação de energia (WEYER, 2000; DINIZ et al., 2008). Animais do grupo VH tiveram PC final superiores aos animais do grupo JH, o que se explica pela menor TMR do primeiro grupo.

A menor ingestão de ração pelos animais que receberam DH em relação aos que receberam dieta controle foi associada ao elevado teor energético da DH (~3.64 kcal/g) comparado à dieta controle (~3.0 kcal/g). De maneira geral, quando a energia ingerida excede o gasto energético, o excesso de energia é depositado como gordura, caracterizando a obesidade. É conhecido o fato que indivíduos mais velhos têm redução da sua composição hídrica, tanto intra como extracelular. O consumo reduzido de líquido nos animais do grupo V aponta para um fator comportamental, mais do que fisiológico que acomete indivíduos mais velhos (IOSSA et al, 1999).

Animais que receberam DH, independentemente da idade, tiveram maior circunferência abdominal, IMC e índice de Lee, quando comparados aos seus

controles com a mesma idade (Tabela 2). Estes aumentos estão diretamente relacionados com o aumento da gordura corporal, bem como dos depósitos de gordura específicos, encontrados nos animais que receberam DH (Fig.6). Aumento do estoque de gordura, principalmente da gordura visceral, eleva os riscos para doenças cardiovasculares (DC) (LUOMA, 2010). Neste trabalho não foram evidenciadas diferenças significantes em relação ao acúmulo de gordura e a idade, podendo sugerir que o consumo de DH antecipa os efeitos do envelhecimento sobre o ganho de gordura corporal (Iossa et al, 2003). Solomon et al (2008) demonstraram uma diminuição da oxidação de lipídios em humanos obesos. Esse fato foi observado nos animais dos grupos VH, indicando que a menor oxidação lipídica pode ter contribuído para o aumento dos depósitos de gordura e conseqüente aumento do risco para DC. A associação entre o metabolismo dos dois principais combustíveis celulares, carboidratos e lipídios, é explicada pelo ciclo de Randle, o qual demonstra a estreita regulação dessas duas vias catabólicas. A “preferência” pela oxidação de lipídios foi decorrente do acréscimo de colesterol e sacarose na DH. A modificação na seleção de nutrientes para oxidação é controlada pelo consumo de carboidratos, desde que quando a oxidação de carboidratos é elevada, ocorre redução na oxidação lipídica, pois a atividade da enzima triacilglicerol lípase do tecido adiposo é inibida pela ação da insulina (DELANY; WEST, 2000; VOET et al., 2000). O que foi mostrado pela primeira vez é que mesmo animais recebendo dieta controle, mas com a idade avançada, apresentam alterações metabólicas que mimetizam o consumo de DH.

Neste estudo analisamos tanto a glicemia em jejum, a resposta glicêmica após sobrecarga de glicose bem como a concentração de IGF-1, uma vez que este se relaciona diretamente com o metabolismo glicolítico (Fig.8).

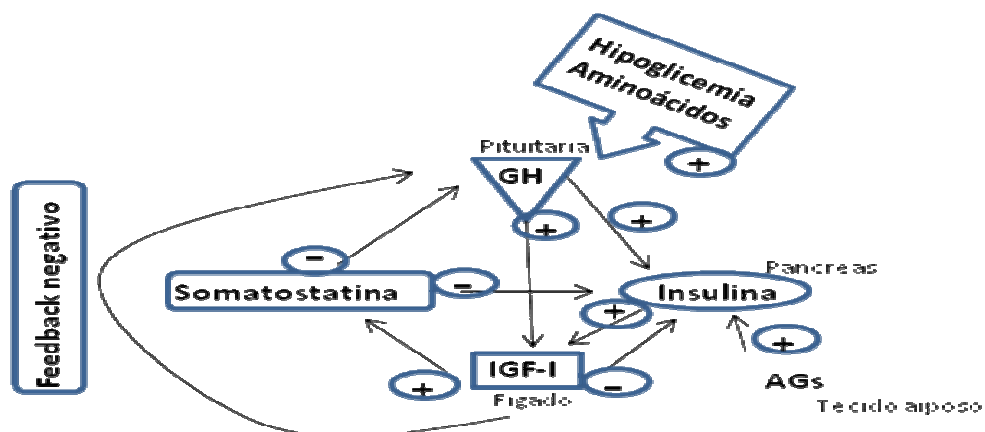


Figura 8. Interrelação IGF-1 com vias metabólicas.
Sinal +: Estimulação. Sinal -: Inibição.

A quantificação da glicemia em jejum, feita após 60 dias, de período experimental, mostrou que os animais dos grupos JC, JH e VC não apresentaram alterações na glicemia. Entretanto, como esperado, animais do grupo VH, tiveram valores elevados para a glicemia, o que pode ser atribuído ao alto teor glicídico ofertado na DH. Os três grupos, JH, VC e VH apresentaram valores glicêmicos superiores aos seus grupos controles após 30' no TOTG (Fig.7), indicando alteração no metabolismo da glicose. Ao final dos 120' a glicemia do grupo JC voltou ao estado basal, o que não foi visto nos outros 3 grupos. Pode-se verificar com esses dados, que tanto os animais jovens alimentados com uma dieta rica em sacarose, bem como animais com idade avançada, apresentaram um estado de hiperglicemia, associada à resistência insulínica e/ou intolerância à glicose (BROWN et al, 2002; WOODS et al, 2003). Embora a glicemia em jejum tenha mostrado valores não alterados, o TOTG simula um estado pós-prandial, no qual a produção, liberação e resposta a insulina se faz necessária, indicando que tanto a DH como o envelhecimento prejudicaram a função pancreática e/ou interferiram em mecanismos relacionados com a captação de glicose sanguínea.

Alguns hormônios são importantes reguladores do peso corporal e gasto energético e suas concentrações estão relacionadas com o envelhecimento, entre eles: insulina, leptina, triiodotironina livre (T3) e GH/IGF-1 (LEIBEL et al, 2002; KUMAR et al, 1999; SEIVA et al, 2010). Sabe-se que o IGF-1 (hormônio de crescimento insulina-símile) pode levar ou mesmo agravar estados pré-diabéticos (MOLLER; JORGENSEN, 2009). A concentração aumentada de IGF-1 (Tabela 3), nos animais que receberam DH, explica, ao menos em parte, essa alteração glicêmica nos animais J e V. Curiosamente, ratos dos grupos H apresentaram maiores concentrações de IGF-I quando comparados a seus controles. Sabe-se hoje que o tecido adiposo secreta uma miríade de substâncias relacionadas à inflamação, bem como hormônios regulatórios. Dentre esses hormônios está o IGF-I. Tendo em vista o aumento de tecido adiposo nos animais dos grupos H, fica evidente a participação dos adipócitos como tipos celulares secretores de IGF-I. Na obesidade pode haver diminuição da secreção de GH, ou diminuição da resposta a testes provocativos na liberação de GH (COPELAND et al., 1990; HAIJMA et al., 2005). Um aumento acentuado da concentração de IGF-I poderia, por um mecanismo de retro-alimentação negativa, inibir a secreção de GH (Fig. 8), apontando para uma possível diminuição, indireta, de GH nos ratos obesos. Embora exista consenso que ocorre diminuição na produção e/ou secreção do hormônio de crescimento (GH) durante o envelhecimento, não foi observada redução do IGF-I, comparando os grupo J e V, e uma diminuição na secreção de GH pode ser responsável por esse achado.

A teoria dos radicais livres, proposta em 1956 por Denham Harman, e aceita até os dias de hoje como a base química para processos que levam ao envelhecimento, leva em conta a ação dos RLs sobre componentes estruturais da célula (proteínas, DNA e lipídios). A fim de verificar o estresse oxidativo (EO) miocárdico, foi quantificada a concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) e a concentração de substâncias

antioxidantes totais (SAT) nos grupos experimentais. Nossos dados deixam claro que o consumo de uma dieta rica em sacarose e colesterol eleva os danos causados pelos RLs no coração, independente da idade (Fig. 8). O HP é resultante de um processo, genericamente, chamado de lipoperoxidação. Neste processo, auto catalítico, RLs reagem com moléculas de ácidos graxos, retirando átomos de H e desta forma produzindo moléculas instáveis quimicamente e que conseqüentemente perdem sua função e/ou estrutura (NOVELLI, 2005). A figura 9 mostra as fases da lipoperoxidação.

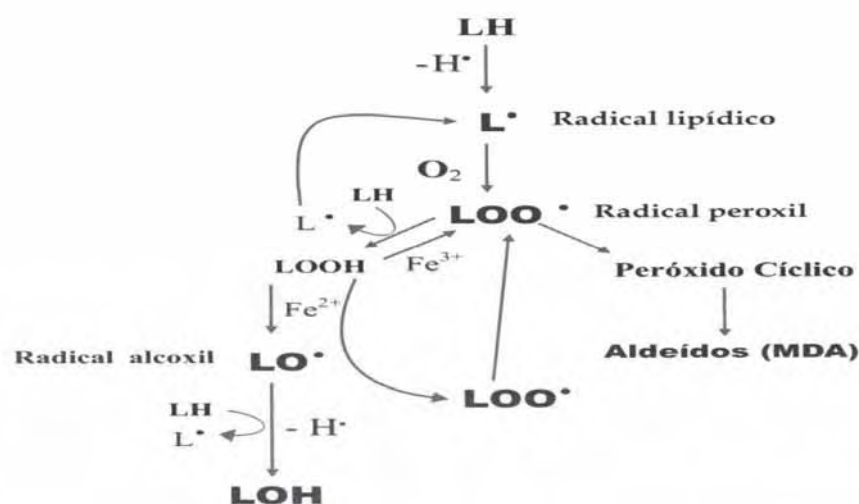


Figura 9. Representação das fases da lipoperoxidação.

LOOH – Hidroperóxido de lipídio. Adaptado de *Nutrição e Vida Saudável*, 2005.

Desta forma, a oferta aumentada de uma dieta rica em ácidos graxos e sacarose elevou os níveis de lipídio circulante nos animais recebendo DH (Fig. 8B), favorecendo a captação de lipídios pelo tecido cardíaco e a ação dos RLs sobre esses compostos, o que refletiu no aumento da concentração de HP. Iossa et al (2003) demonstraram que dieta rica em ácidos graxos prejudica a capacidade respiratória mitocondrial no músculo esquelético e fígado. A ocorrência deste fato no músculo cardíaco pode induzir aumento na geração de RLs a partir da cadeia de transporte de elétrons (SEIVA et al., 2008). A redução no HP no grupo VC comparado ao JC

indicou que a idade não é um fator crucial para o aumento do dano oxidativo no músculo cardíaco, embora a porcentagem de SAT tenha diminuído nesse grupo. As SAT compreendem compostos antioxidantes, enzimáticos ou não-enzimáticos, lipofílicos ou aquosos (NOVELLI, 2005) e a diminuição na porcentagem de SAT relacionada à idade, esta de acordo com a literatura que mostra redução das defesas do organismo com o avançar da idade (BROWN-BORG, 2007). O desequilíbrio nos sistemas oxidante/antioxidante foi claramente evidenciado nos animais do grupo VH, desde que houve aumento na concentração do HP miocárdico, a despeito da elevação na SAT nestes animais.

Curiosamente, a concentração de triacilglicerol (TG), bem como de colesterol total e suas frações não foi alterada pela idade (Fig. 5). Pessoas com idade avançada apresentam redução dos marcadores sorológicos (perfil lipídico) que elevam o risco para doença arterosclerótica (LUOMA, 2010). Níveis reduzidos de colesterol-LDL, bem como aumento do colesterol-HDL e da relação HDL/colesterol total foram encontrados em indivíduos centenários, comparadas com pessoas setuagenárias (MALAGUARNERA et al, 1998; SUZUKI et al, 2001). Logicamente, vários fatores devem influenciar o metabolismo lipídico, como a composição corpórea, fatores ambientais, atividade física, tipo de dieta e medicamentos. Nosso estudo deixou claro que o consumo alimentar é um importante fator a ser considerado. Animais do grupo JH tiveram aumentadas as concentrações de colesterol total, índice aterogênico e colesterol-LDL (Fig. 5), indicando que mesmo em ratos jovens o consumo de DH implica em elevação de fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Também foi possível evidenciar o efeito conjunto do envelhecimento e consumo de DH. Desde que a dieta rica em sacarose é considerada lipogênica, longos períodos de ingestão de dietas ricas em carboidrato induzem a conversão de glicose em ácidos graxos e triacilglicerol no tecido hepático. O triacilglicerol hepático é transportado na

circulação pelas partículas de colesterol VLDL, explicando assim a elevação de TG, colesterol total e VLDL nos animais do grupo VH.

Comparando os grupos JH e VH, nossos dados apontam para efeitos benéficos encontrados em animais com idade avançada, como a redução do colesterol total, do colesterol LDL e do IA, bem como aumento do colesterol HDL. O organismo conta com mecanismos naturais para proteção dos efeitos adversos induzidos pelo consumo de dietas ricas em lipídios (LUOMA, 2010). Dieta rica em colesterol aumenta a expressão das enzimas hepáticas do citocromo P450, que induzindo o catabolismo da gordura até óxidos de esterol, diminui os efeitos tóxicos do colesterol (LUOMA, 2008). Esse tipo de dieta também pode provocar a ativação dos receptores X no tecido hepático, reduzindo o processo aterosclerótico, uma vez que aumentam a expressão de genes relacionados ao metabolismo do colesterol (LEHRKE et al, 2005). Independente dos mecanismos envolvidos fica claro que o fator “dieta” é fundamental para o aumento dos fatores de risco para doenças cardíacas, independente da idade. De fato, foi possível observar que animais dos grupos VH e JH apresentaram efeitos adversos na lipidemia, comparados aos dos grupos VC e JC respectivamente.

Animais considerados velhos, mas não os considerados jovens, parecem contar com mecanismos protetores que minimizam os danos causados pelo consumo da DH. Cabe ressaltar aqui que os animais velhos, neste estudo iniciaram o tratamento com DH a partir dos 510 dias de vida e que, portanto os efeitos em longo prazo da dieta em questão não foram avaliados.

Em relação ao metabolismo energético cardíaco nota-se uma diminuição da porcentagem protéica nos animais com idade avançada. Essa diminuição pode estar associada à perda de massa muscular que acompanha o envelhecimento (DAVY et al, 2001). O metabolismo miocárdico foi estudado através das atividades de enzimas-

chave do metabolismo cardíaco, entre elas a citrato sintase (CS), responsável pela entrada de metabólitos no ciclo do citrato, lactato desidrogenase (LDH) e fosfofrutoquinase (PFK), marcadoras do metabolismo glicolítico, ambas indicadoras do fluxo de metabólitos na via da glicólise, bem como da piruvato desidrogenase (Pi-DH), que catalisa a conversão do piruvato proveniente da glicólise em acetil-CoA, substrato para o ciclo do citrato (Figura 3). As atividades da CS e LDH sofreram influência apenas do envelhecimento, uma vez que não houve alteração entre os grupos JC e JH, bem como VC e VH (Tabela 5). A CS é responsável por importar acetil-coA, oriundo tanto do catabolismo da glicose como de ácidos graxos, para a geração de equivalentes redutores (NADH e FADH) durante o ciclo do citrato.

O grupo JH teve aumentada a atividade da enzima Pi-DH, devido à maior oferta de sacarose da dieta. O aumento da atividade desse complexo enzimático gera mais acetil-coA para entrada no ciclo do citrato. Este por sua vez é um potente inibidor alostérico da enzima PFK, o que explica a redução da atividade desta enzima. Tanto a DH como a idade, afetaram o glicogênio miocárdico (Fig. 9). A diminuição da enzima PFK corrobora esse achado e representa uma resposta adaptativa ao excesso de lipídios ofertados na DH (NEMETH et al, 1992). O aumento dos estoques de glicogênio pode ser explicado pelo excesso de energia proveniente do consumo de DH e/ou pela maior disponibilidade de insulina nos animais dos grupos H, uma vez que esse hormônio estimula a glicogênio-sintase, responsável pela síntese de glicogênio. Glicogênio miocárdico é importante fator no dano cardíaco, constituindo potencial fonte energética em condições de hipóxia (DINIZ et al., 2002). A diminuição da via glicolítica pode estar associada também ao aumento de glicogênio no miocárdio que pode estimular o complexo Pi-DH, via próprio piruvato, que é um potente inibidor da proteína quinase responsável por inativar o complexo Pi-DH (LOPASCHUCK et al., 2009).

Em relação à idade, nota-se que o coração dos animais velhos apresentou redução na utilização da glicose como substrato energético, fato associado à redução das enzimas PFK e Pi-DH. Nestas condições, a elevação na atividade da CS está associada ao excesso de acetil-CoA oriundo do metabolismo de ácidos graxos. O citrato formado inibiu a atividade da PFK e por consequência reduziu a formação de intermediários glicolíticos, diminuindo assim a atividade do complexo Pi-DH. A interconversão entre piruvato/lactato e lactato/piruvato, realizada pela enzima LDH, é mantida dentro de um equilíbrio estequiométrico próximo a um. Aumentos na concentração de lactato, que ocorrem durante o envelhecimento, deslocam essa reação para a esquerda, gerando mais piruvato. Essa produção de piruvato, através de uma reação anapleurótica, servirá como um repositor de oxaloacetato no ciclo do citrato, corroborando o aumento na atividade da CS. Uma das possíveis causas do aumento da concentração de lactato nos animais do grupo V é a diminuição do aporte sanguíneo miocárdico (anaerobiose). Essa redução do catabolismo da glicose explica o aumento do glicogênio miocárdico encontrado nos animais VC, já que a glicose não utilizada é armazenada na forma de glicogênio. Esses achados permitiram evidenciar que o músculo cardíaco em animais jovens, foi capaz de fazer ajustes metabólicos em resposta aos fatores dietéticos, o que não foi visto nos animais com idade avançada.

Conclui-se, portanto que tanto o consumo de DH como o envelhecimento prejudicaram, de forma não sinérgica, o metabolismo geral e cardíaco de ratos. As alterações calorimétricas, como diminuição da TMR/PC e aumento do QR, foram associadas ao aumento do IMC e índice de Lee, bem como a modificações nos estoques de gordura corporal. O envelhecimento e o consumo de dieta hipercalórica alteraram consideravelmente a lipidemia e a glicemia, assim como os estoques de glicogênio e a geração de energia miocárdica. A redução das taxas metabólicas de repouso no envelhecimento, bem como a resposta glicêmica prejudicada podem ser

utilizadas como possíveis indicadores para o desenvolvimento de obesidade durante o envelhecimento e conseqüentemente, aumento do risco para doenças cardiovasculares. Ficam aqui sugeridos estudos que visem estratégias que minimizem e/ou evitem a hiperglicemia, bem como restabeleçam o gasto energético durante o envelhecimento e desta forma contribuam para a manutenção da qualidade de vida em pessoas idosas.

- **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Segundo ABNT – NBR 10520.

ASTRUP A, et al. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. **Am J Clin Nutr.**, v.59, p.350-5, 1994.

ASTRUP A, RABEN A. Sugar as a slimming agent?. **Br J Nutr.**, v.84, p. 585-586,2000.

ATTALLAH H, FRIEDLANDER AL, HOFFMAN AR. Visceral obesity, impaired glucose tolerance, metabolic syndrome and growth hormone therapy. **GH & IGF-I research.**, v.16, p.62-7, 2006.

AVIRAM M, EIAS K. Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. **Ann. Nutr. Metab.**, v.37, p.75-84, 1993.

BAIK I, et al. Adiposity and mortality in men. **Am J Epidemiol.**, v.152, p.264-71, 2000.

BARZILAI N, ROSSETTI L. Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. **Am. J. Physiol.**, v.269, p.E591-E597,1995.

BASS A, et al. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level enzymatic organization. **European J Biochem.**, v.11, p.198-206, 1969.

BERNARDIS LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's Nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. **Experientia.**, v.26,p.789-790, 1970.

BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.**, v.37, p.911-917, 1959.

BROWN JL, SPICER MT, SPICER LJ. Effect of high-fat diet on body composition and hormone responses to glucose tolerance tests. **Endocrine.**, v.19, p.327-332, 2002.

BROWN-BORG HM. Hormonal regulation of longevity in mammals. **Ageing Res Rev.**, v.6, p.28-45, 2007.

CASTILLO C, et al. Effect of recombinant human growth hormone on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats. **Biogerontology.**, v.6, p.303-12, 2005.

COMMERFORD SR, et al. Fat oxidation, lipolysis and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.279, p.875-85, 2000.

COPELAND KC, et al. The relationship between insulin-like growth factor-I, adiposity and aging. **Metabolism.**, v.39, p. 584-7; 1990.

- DAVY KP, et al. Regulation of macronutrient balance in healthy young and older men. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v.25, p.1497-1502, 2001.
- DELANY JP, WEST DB. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. **J Am Coll Nutr.**, v.19, p.487S-93S, 2000.
- DESAI KM, WU L. Free radical generation by methylglyoxal in tissues. **Drug Metabol.**, v.23, p.151-173, 2008.
- DESAI KM, et al. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy? **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.88, p.273-284, 2010.
- DINIZ, YS, et al Toxicity of dietary restriction of fat enriched diets on cardiac tissue. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, p.1892-1899, 2002.
- DINIZ YS, et al. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. **Nutrition.**, v.21, p.749-55, 2005.
- DINIZ YS, et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **Int J Cardiology.**, v.124, p.592-599, 2008.
- FRISARD MI, et al. Aging, resting metabolic rate, and oxidative damage: results from the Louisiana Healthy Aging Study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v.62,p.752-759, 2007.
- GILCA M, et al. The oxidative hypothesis of senescence. **J. Postgrad. Med.**, v.53,p.207-213, 2007.
- GORMAN M. Development and the rights of older people. In: Randel J, et al., eds. The ageing and development report: poverty, independence and the world's older people. **Earthscan Publications Ltd**, London., p.3-21,1999.
- HAIJMA SV, et al. The GHRH/GHRP-6 test for diagnosis of GH deficiency in elderly or severely obese men. **Eur J Endocrinol.**, v.152, p.575-580; 2005.
- HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, v.11, p.298-300, 1956.
- HINMAN LM, BLASS JP. An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates. **J Biol Chem.**, v.256, p. 6583-6586, 1981.
- IOSSA S, et al. Hepatic mitochondrial respiration and transport of reducing equivalents in rats fed an energy dense diet. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.19, p.539-543, 1995.
- IOSSA S, et al. Energy balance and liver respiratory activity in rats fed on an energy-dense diet. **Br. J. Nutr.**, v.77, p. 99-105, 1997.
- IOSSA S, et al. Energy intake and utilization vary during development in rats. **J Nutr.**, v.129, p.1593-1596, 1999.

- IOSSA S, et al. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. **Br. J. Nutr.**, v.90, p.953-960, 2003.
- JÉQUIER E. Pathways to obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v.26 Suppl 2, p.S12-S17, 2002.
- JIANG, ZY, WOOLLARD, AC, WOLF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. **Lipids.**, v.26, p. 853-856, 1991.
- JUGDUTT BI. Aging and heart failure: changing demographics and implications for therapy in the elderly. **Heart Fail. Rev.**, v.15, p.401-405, 2010.
- KREMS C, et al. Lower resting metabolic rate in the elderly may not be entirely due to changes in body composition. **Eur J Clin Nutr.**, v.59, p.255-262, 2005.
- KUMAR MV, MOORE RL, SCARPACE PJ. Beta3-adrenergic regulation of leptin, food intake, and adiposity is impaired with age. **Pflugers Arch.**, v.438, p.681-688, 1999.
- LABAYEN I, FORGA L, MARTINEZ JA. Nutrient oxidation and metabolic rate as affected by meals containing different proportions of carbohydrate and fat, in healthy young women. **Eur J Nutr.**, v.38, p.158-166, 1999.
- LEHRKE M, et al. Diet-dependent cardiovascular lipid metabolism controlled by hepatic LXR alpha. **Cell Metab.**, v.1, p.297-308, 2005.
- LEIBEL RL. The role of leptin in the control of body weight. **Nutr Rev.**, v.60, p.S15-19, 2002.
- LISSNER L, HEITMANN BL. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. **Eur J Clin Nutr.**, v.49, p.79-90, 1995.
- LOWRY OH, ROSEMBROUGH NL, FARR AL. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **J Biol Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- LUOMA PV. Cytochrome P450 and gene activation--cholesterol elimination and regression of atherosclerosis: author reply to the commentary. **Eur J Clin Pharmacol.**, v.65, p.105-106, 2008.
- LUOMA PV. Gene activation regresses atherosclerosis, promotes health, and enhances longevity. **Lipids Health Dis.**, v.6, p.9-67, 2010.
- MALAGUARNERA M, et al. Lipid profile variations in a group of healthy elderly and centenarians. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v.2, p.75-79, 1998.
- MEDVEDV ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v.65, p.375-398, 1990.
- MEHMETCIK G, TOKER G, UYSAL, M. Endogenous and copper-induced lipid hydroperoxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. **Horm. Metab. Res.**, v.29, p.63-65; 1997.

- MØLLER N, JØRGENSEN JOL. Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. **Endocrine Rev.**, v.30, p.152-177, 2009.
- NEMETH PM, et al. Metabolic response to a high-fat diet in neonatal and adult rat muscle. **Am J Physiol.**, v.262, p.C282-C286, 1992.
- NOVELLI ELB, FERNANDES AAH, CAMPOS KE. The adverse effect of high energy dense diet on cardiac tissue. **J Nutr Environ Med.**, v.12, p.287-294, 2002.
- NOVELLI ELB. Radicais livres e estresse oxidativo. In: **Nutrição e vida saudável**. Ed. Tecmedd, p.97-99, 2005.
- PARFITT VJ, et al. A comparison of antioxidant status and free radical peroxidation of plasma lipoproteins in healthy young persons from Naples and Bristol. **Eur Heart J.**, v.15, p.871-876, 1994.
- QUILES JR, et al. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. **Nutrition.**, v.19, p. 363-368, 2003.
- REEVES PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr.**, v.127, p. 838-841, 1997.
- RIZZO MR, et al. Resting metabolic rate and respiratory quotient in human longevity. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.90, p.409-413, 2005.
- REXRODE KM, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. **JAMA.**, v.280, p.1843-1848, 1998.
- SEIVA FR, et al. Energy expenditure, lipid profile, oxidative stress, and cardiac energy metabolism after growth hormone treatment in obese young rats. **Horm Metab Res.**, v.42, p.496-501, 2010.
- SEMSEI I. On the nature of aging. **Mech Ageing Dev.**, v.117, p.93-108, 2000.
- SOLOMON TP, et al. Effects of aging on basal fat oxidation in obese humans. **Metabolism.**, v.57, p.1141-1147, 2008.
- ST-ONGE MP, GALLAGHER D. Body composition changes with aging: The cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation? **Nutrition.**, v.26, p.152-155, 2010.
- STROHL KP, et al. Ventilation and metabolism among rat strains. **J Appl Physiol.**, v.82, p.317-323, 1997.
- SUZUKI M, WILCOX BJ, WILCOX CD. Implications from and for food cultures for cardiovascular disease: longevity. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v.10, p.165-171, 2001.
- VIÑA J, BORRÁS C, MIQUEL J. Theories of ageing. **IUMB Life.**, v.59, p.249-254, 2007.
- VOET D, VOET JG, PRATT CW. Fundamentos de Bioquímica. Poto Alegre : **Artmed**, 2000.

WEINERT BT, TIMIRAS PS. Invited review: theories of aging. **J. Appl. Physiol.**, v.95, p.1706-1716, 2003.

WEYER C, et al. Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: A stumetabolic adaptation to long-term weight change. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.85, p.1087-1094, 2000.

WILSON-FRITCH L, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. **J Clin Invest.**, v.114, p.1281-1289, 2004.

WOODS SC, et al. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. **J Nutr.**, v.133, p. 1081-1087, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 1998.

CAPÍTULO 2

**GASTO ENERGÉTICO, PERFIL LIPÍDICO, ESTRESSE
OXIDATIVO E METABOLISMO ENERGÉTICO
CARDÍACO APÓS O TRATAMENTO COM HORMÔNIO
DE CRESCIMENTO EM RATOS JOVENS E OBESOS.**

RESUMO.

Apesar dos avanços científicos e dos esforços feitos no combate a obesidade, esta continua sendo um sério problema de saúde (WOODS et al, 2003). Obesidade pode ser caracterizada como um estado no qual há aumento do depósito de gordura. Estimativas da organização mundial da saúde são de que para o ano de 2015, aproximadamente 2.3 bilhões de pessoas apresentem sobrepeso e haja mais de 700 milhões de obesos no mundo (WHO, 2008). Embora o fator genético seja um importante parâmetro a ser considerado, está cada vez mais claro que, os hábitos alimentares, bem como a diminuição das atividades físicas, sejam fatores relevantes a serem considerados (ASTRUP et al., 1994; LISSNER, 1995).

O consumo de dietas hipercalóricas (DH) é considerado uma das principais causas da obesidade (THOMAS et al., 1995). Estudos apontam para uma relação entre maior risco cardiovascular e aumento da gordura corporal (total, subcutânea ou visceral) (REXRODE et al. 1998; BAIK et al., 2000; ATTALLAH et al., 2006).

Estudos recentes em nosso laboratório (DINIZ et al., 2006; EBAID et al., 2006; NOVELLI et al., 2007) indicaram que elevada ingestão de sacarose induziu obesidade em ratos, com aumento significativo no índice de massa corporal (IMC) e elevação significativa na adiposidade abdominal. Uma vez que dietas ricas em carboidratos refinados estão cada vez mais presentes para o consumo diário das populações, associado ao elevado conteúdo de gordura das dietas. Fica clara, portanto a importância do hábito alimentar no desenvolvimento da obesidade e de comorbidades advindas desse hábito. Os mecanismos que acompanham o desenvolvimento da obesidade podem ser evidenciados através de animais de laboratório, tratados com dietas com elevado valor calórico (LEVIN et al., 2003; WOODS et al. 2003; NASCIMENTO et al, 2008).

A relação entre morfometria e obesidade está bem estabelecida em humanos (ATTALLAH et al., 2006) e o acúmulo de triacilgliceróis na região abdominal e a elevação no índice de massa corporal são reconhecidamente, componentes críticos da obesidade, sendo utilizados como indicativo de alterações metabólicas. Entretanto, ainda não há um consenso sobre como o acúmulo de gordura leva a alterações importantes na homeostase do indivíduo.

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 deficiência de GH (DGH) podem afetar de maneiras diversas o sistema cardiovascular. 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 reduziu os riscos para doenças cardiovasculares (MAISON; CHANSON, 2003).

O GH atua sobre vários processos metabólicos que levam ao crescimento, incluindo o metabolismo de lipídios e de carboidratos. Por outro lado, o controle na produção e secreção do GH está sob importante influência de uma rede de sinais periféricos complexos de natureza metabólica, tais quais concentrações de ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos, entre outros (OZATA et al., 2003).

Embora existam várias terapias visando eliminar ou amenizar os riscos que acompanham a obesidade, ainda não há uma forma terapêutica única e consensual

para tal, desta forma o objetivo deste estudo foi verificar se o GH pode ser útil como uma terapia adjunta para reduzir os danos cardiovasculares e bioquímicos causados pela obesidade induzida por dieta, em animais considerados jovens.

Para esse estudo 32 ratos Wistar machos, com 75 dias de vida, foram divididos inicialmente em dois grupos (n=16). O grupo C, considerado controle, recebeu ração padrão (Purina Labina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais do grupo hipercalórico (H) receberam ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol e solução aquosa de sacarose 30% na água de beber. O objetivo desta dieta foi induzir alterações metabólicas semelhantes às aquelas encontradas na obesidade. Esta dieta foi mantida até o final do experimento.

Após 45 dias, os animais do grupo C e H foram divididos em dois subgrupos:

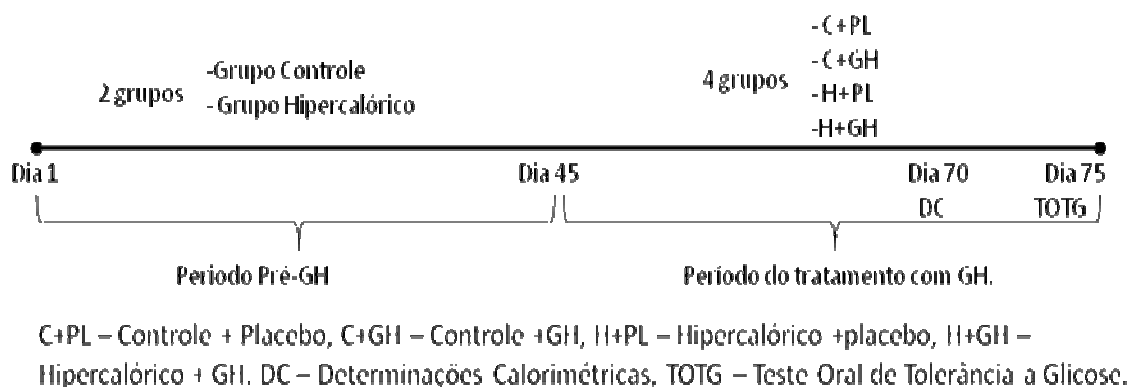
C+GH (n=8) - mantidos com ração padrão e recebendo GH na dose de 2mg/kg, sc, cinco dias da semana (PÉREZ-ROMERO et al.,1999; CASTILLO et al., 2005);

C+PL (n=8) - mantidos com ração padrão, recebendo solução salina (NaCl, 0,9%), sc, cinco dias da semana;

H+GH (n=8) - mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol, solução aquosa de sacarose 30% na água de beber e recebendo GH na dose de 2mg/kg, sc, cinco dias da semana;

H+PL (n=8) - mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol, solução aquosa de sacarose 30% na água de beber e recebendo solução salina (NaCl, 0,9%), sc, cinco dias da semana.

A duração do tratamento com o GH foi de 30 dias, totalizando 75 dias de experimento. A figura abaixo mostra o delineamento experimental do estudo.



Após os 75 dias de período experimental, animais do grupo H+PL foram considerados obesos, apresentando maior peso corporal final, IMC (índice de massa corporal), índice de Lee e índice aterogênico, comparados aos animais do grupo C+PL. A obesidade também levou a um aumento da concentração de hidroperóxido de lipídio miocárdico e da atividade da enzima lactado desidrogenase, bem como a diminuição da taxa metabólica de repouso e da relação consumo de O_2 /peso corporal. O tratamento com GH, nos animais do grupo H, aumentou a taxa metabólica de repouso e reduziu o índice aterogênico e as concentrações de hidroperóxido de lipídio cardíaco, um importante marcador do estresse oxidativo miocárdico. Em animais jovens e controles, o GH não alterou parâmetros morfométricos, perfil lipídico e estresse oxidativo, sendo, portanto uma dose segura ou incapaz de causar danos em ratos tratados com dieta controle. Este tratamento também elevou a taxa metabólica de repouso, no estado alimentado, bem como a atividade da enzima piruvato desidrogenase cardíaca, uma importante enzima chave que regula a entrada de intermediários no ciclo do citrato, gerando energia para o metabolismo cardíaco (BASS et al, 1969).

A partir dos resultados encontrados pôde-se verificar que o GH melhorou o perfil lipídico, diminuiu o estresse oxidativo miocárdico e aumentou o gasto energético em animais jovens e considerados obesos. Em animais controle o GH, elevando a

atividade da piruvato desidrogenase, apresentou importante efeito modulador do metabolismo de glicídios, otimizando a utilização de glicose para a geração de energia disponível para o tecido cardíaco.

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados na Revista *Hormone and Metabolic Research*, v.42; pag 496-501, 2010, com a participação e co-autoria de Berbert CMS, Souza, GA, Rocha KKH, Ebaid, GMX, Burneiko, RCM e Novelli, ELB.

Energy Expenditure, Lipid Profile, Oxidative Stress, and Cardiac Energy Metabolism After Growth Hormone Treatment in Obese Young Rats

Authors

F. R. F. Seiva¹, C. M. S. Berbert², G. A. Souza¹, K. K. H. Rocha², G. M. X. Ebaid¹, R. C. M. Burneiko³, E. L. B. Novelli²

Affiliations

Affiliation addresses are listed at the end of the article

Key words

- growth hormone
- calorimetry
- lipid profile
- heart
- energy metabolism
- oxidative stress

Abstract

Obesity is rampant in modern society and growth hormone (GH) could be useful as adjunct therapy to reduce the obesity-induced cardiovascular damage. To investigate GH effects on obesity, initially 32 male Wistar rats were divided into two groups (n=16): control (C) was fed standard-chow and water and hypercaloric (H) was fed hypercaloric chow and 30% sucrose in its drinking water. After 45 days, both C and H groups were divided into two subgroups (n=8): C+PL was fed standard-chow, water and received saline subcutaneously; C+GH was fed standard-chow, water, and received 2 mg/kg/day GH subcutaneously; H+PL was fed hypercaloric diet, 30% sucrose in its drinking water, and received saline subcutaneously; and H+GH was fed hypercaloric diet, 30% sucrose in its drinking water, and received GH subcutaneously. After 75 days of total experimental period, H+PL rats were considered obese, having higher body weight, body mass index, Lee-index, and atherogenic index (AI) compared to C+PL. Obesity was accompanied by enhanced myocardial lipid

hydroperoxide (LH) and lactate dehydrogenase (LDH), as well of depressed energy expenditure (RMR) and oxygen consumption(VO_2)/body weight. H+GH rats had higher fasting RMR, as well as lower AI and myocardial LH than H+PL. Comparing C+GH with C+PL, despite no effects on morphometric parameters, lipid profile, myocardial LH, and LDH activity, GH enhanced fed RMR and myocardial pyruvate dehydrogenase. In conclusion, the present study brought new insights into the GH effects on obesity related cardiovascular damage demonstrating, for the first time, that GH regulated cardiac metabolic pathways, enhanced energy expenditure and improved the lipid profile in obesity condition. Growth hormone in standard fed condition also offered promising therapeutic value enhancing pyruvate-dehydrogenase activity and glucose oxidation in cardiac tissue, thus optimizing myocardial energy metabolism.

received 17.10.2009
accepted 24.02.2010

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249651>

Published online:

March 31, 2010

Horm Metab Res 2010;

42: 496–501

© Georg Thieme Verlag KG

Stuttgart · New York

ISSN 0018-5043

Correspondence

E. L. B. Novelli

Department of Chemistry and Biochemistry

Institute of Biological Sciences

São Paulo State University

UNESP

18618-000 Botucatu

São Paulo, Brazil

Tel.: +55/14/3811 6255

Fax: +55/14/3815 3744

drno@uol.com.br

Introduction

Obesity is a growing public health problem associated with increasing morbidity and mortality. Sucrose rich diet has been blamed as causally related to the incidence of obesity in populations [1], and is an important modulator of the obesity-induced cardiovascular consequences [2]. There is consensus that obesity directly or indirectly increases considerably the risks for cardiovascular diseases [3] by changing the cardiac function [4]. Although the mechanisms that are triggered are not yet well established, myocardial lipotoxicity [5], enhanced fatty acid uptake and oxidation [6], reduced carbohydrate oxidation

[2], insulin resistance, and/or impaired glucose tolerance [7] have been associated with cardiac pathologies. However, these factors can act simultaneously, or in an isolated way and not all of these conditions are observed in obesity situation.

Obesity can also be accompanied by some endocrine and metabolic abnormalities, such as decreased serum growth hormone (GH) levels [8]. Several experimental and clinical studies have demonstrated controversial results after GH administration in obesity conditions [8,9]. Some works indicate little or no beneficial effects [10], but there are studies suggesting that GH therapy leads to metabolic improvement, such as

decreased visceral adiposity and beneficial changes on lipid profile [9–11]. Visceral fat deposition is considered one important predictor for coronary artery disease and heart failure [12], but whether GH could reduce the fat deposition, or to improve the lipid profile is not completely clear.

It is well known that GH can act as anabolic or diabetogenic hormone and that many pathways can regulate and be regulated by GH/insulin axis [8, 13]. However, whether GH effects are associated with changes in energy intake, energy expenditure or a combination of both factors is still unclear. Cardiac muscle utilizes a variety of substrate to produce energy and the heart can shift from one substrate to another depending on food intake and hormonal regulation. However, the effects of GH on cardiac energy metabolism in obesity are not clearly understood. Although studies on obesity have been reported in a scattered fashion, the association of sucrose-rich diet-induced obesity and GH administration has drawn little attention until recently. Thus, the aim of this study was to analyze the effects GH on energy expenditure, lipid profile, myocardial oxidative stress, and energy metabolism in cardiac tissue of control and obese young rats. Animal models are useful for increasing the understanding of the effects of diet and the development of obesity related abnormalities, particularly on cardiac tissue [2, 14, 15]. Therefore, we used a rat model to study the GH effects on an unresolved issue in the field of obesity and health by the treatment of obesity-related cardiac disease.

Materials and Methods

Obesity induction and experimental treatment

All experiments and procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health and were approved by the Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. Thirty-two male Wistar rats, 75 days of age, were individually housed in polypropylene cages in an environmentally-controlled clean air room with a temperature of $22 \pm 3^\circ\text{C}$, a 12-h light-dark cycle, and a relative humidity of $60 \pm 5\%$.

Initially the animals were randomly divided into two groups. The control group (C, $n=16$) received water ad libitum and standard rodent chow (3074 SIF, Purina Ltda., Campinas, SP, Brazil) containing (by weight) 19.90% protein, 30.03% carbohydrate, 3.80% fat, 13.36% fiber, and 3.00 kcal/g of metabolizable energy. The hypercaloric group (H, $n=16$) was fed a hypercaloric chow and 30% sucrose in drinking water ad libitum.

To induce obesity the hypercaloric chow was obtained mixing 203.7 g sucrose and 88.26 g of soybean oil to 1000 g of a previously triturated standard chow. The dietary ingredients were homogenized in 60°C warm distilled water and the homogenate was used to prepare the pellets. The proportions of dietary protein, carbohydrate, and fat were determined by direct analysis [16]. The hypercaloric chow contained (by weight) 18.00% protein, 47.59% carbohydrate (20.37% sucrose), 11.41% fat, 5.43% fiber, and 3.64 kcal/g of metabolizable energy. Food intake and drinking solutions consumption were evaluated daily at the same time (9–10 h), as the difference between food and drinking solution given and the leftover. The body weights were determined once a week.

In order to more appropriately study the effects of GH on obesity, after 45 days of dietary treatments, both C and H groups

were then randomly divided into two subgroups ($n=8/\text{group}$): (C+PL) control, fed standard chow, water, and saline infusion subcutaneously (NaCl 0.9%); (C+GH) fed standard chow, water, and received 2 mg/kg/day rhGH; (H+PL) continued to eat hypercaloric diet, 30% sucrose in its drinking water, and received saline; (H+GH) continued to eat hypercaloric diet, 30% sucrose in its drinking water, and received GH. The dose of 2 mg/kg/day GH (Hormotrop[®] 4UI, Lab. Bergamo, São Paulo, Brazil) was daily injected, subcutaneously [17], during 30 days, totaling 75 days of experimental period. The GH dose and treatment period were chosen based on studies showing effects of GH on morphometric parameters in obese rats [18, 19]. Food intake, caloric value of chows and caloric value of sucrose solution (4 kcal/g), were used to obtain total energy intake (EI, kcal/day). The body mass index (BMI) (g/cm^2) = body weight/total length², and Lee index (g/cm) = $\sqrt[3]{\text{body weight}/\text{total length}}$ were also calculated [6, 20].

Indirect calorimetry

After 25 days of the GH administration (70 days of the experimental period), the rats were placed into metabolic chambers (airflow = 1.0 l/min) of a computer-controlled indirect calorimeter (CWE, Inc, St. Paul, USA) to determine the fed calorimetric parameters. For assessment of fasting calorimetric parameters, rats were fasted overnight (12–14 h) and placed into metabolic chambers. Respiratory quotient (RQ) and energy expenditure, namely resting metabolic rate (RMR) were measured using a respiratory-based software program (software MMX, CWE, Inc., USA). Average oxygen consumption (VO_2) and average carbon dioxide production (VCO_2) were integrated over periods of 15 min. Carbohydrate and fat oxidation were calculated from the no protein oxygen consumption and the amount of oxygen consumed per gram of substrate oxidized [21].

Serum and myocardial analysis

After 30 days of GH treatment (75 days of total experimental period), animals were fasted (12–14 h) and anesthetized with 0.1 ml i.p. of 1% sodium pentobarbital for measurement of the body length [16]. After the corporal measurement, the anesthetized animals were sacrificed by decapitation [2, 4–6, 14–21]. Total blood was collected by a funnel into a centrifuge tube and allowed to clot to obtain the serum. Serum samples were used for triacylglycerol, cholesterol, and its fraction determinations by enzymatic methods (test Kit CELM, Modern Laboratory Equipment Company, São Paulo, Brazil). The atherogenic index (AI) was determined as total cholesterol/HDL ratio [22]. Heart was rapidly removed and weighed. The left ventricle was separated and stored at -86°C for subsequent analysis. For total protein [23], lipid hydroperoxide [24], and enzymes determinations, left ventricle samples of 200 mg were homogenized in 5 ml of a cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Tissue homogenates were prepared in a motor driven Teflon glass Potter Elvehjem, tissue homogenizer (1 min, $100 \times \text{g}$). The homogenate was centrifuged at $10000 \times \text{g}$ for 15 min, and the supernatant was used for determination of several cardiac key metabolic enzymes. The lipid hydroperoxide (LH) was measured through hydroperoxide-mediated oxidation of Fe^{2+} , with 100 μl of sample and 900 μl of a reaction mixture containing 250 μM FeSO_4 , 25 mM H_2SO_4 , 100 μM xylitol orange, and 4 mM butylated hydroxytoluene (BHT) [24]. Cardiac energy metabolism was assessed by lactate dehydrogenase (LDH; E.C.1.1.1.27.), citrate synthase (CS; E.C.4.1.3.7.), phosphor fructokinase (PFK; E.C.2.7.1.11.), and pyruvate dehydrogenase (PiDH; E.C. 1.2.1.51) activities [25]. Enzyme

activities were performed at 25°C using a microplate reader (μQuant-MQX 200 with Kcjunior software to computer system control, Bio-Tec Instruments, Winooski, Vermont, USA). The spectrophotometric determinations were performed in a Pharmacia Biotech spectrophotometer with temperature-controlled cuvette chamber (UV/visible Ultrospec 5000 with Swift II Applications software to computer system control, 974213, Cambridge, England, UK).

Statistical analysis

Analysis of variance for two variables (Two Way-ANOVA) was used to examine the diet and GH treatment effects. Comparison between the means was performed by Tukey test, with $p \leq 0.05$ (SigmaStat software for windows, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Results

General characteristics of rats and nutritional parameters

As previously observed [2,6] obesity was evidenced in H rats after 45 days of the experimental period, and H rats had higher body weight than C. After 75 days of experimental period H+PL rats had higher body weight, body weight gain, body mass index, and Lee index than C+PL. Growth hormone had no effects on final body weight and on morphometric parameters in both dietary conditions. There were no significant changes in food consumption between C+GH and C+PL, as well between H+GH and H+PL, but the energy intake was higher in C+GH than in C+PL (Table 1).

Calorimetric parameters, serum, and myocardial analysis

There were no significant differences in VO_2 and VCO_2 between the groups, but fed and fasting RMR, fed VO_2 /body weight, fed and fasting VCO_2 /body weight were lower in H+PL than in C+PL. C+GH rats had higher fed RMR, and lower fasting fat oxidation, fed and fasting VCO_2 /body weight than C+PL. H+GH significantly differed from H+PL rats by lower fed VO_2 /body weight, fed and fasting VCO_2 /body weight, as well as higher fasting RMR, fed RQ, and fed fat oxidation. Fed carbohydrate oxidation was higher in all experimental groups than in C+PL, with H+GH rats having the highest value. Fasting carbohydrate oxidation was lower in all groups than in C+PL. The carbohydrate oxidation as well VCO_2 /body weight were lower in fasting than in fed state for C+GH, H+PL and H+GH rats (Table 2).

Hypercaloric diet enhanced cardiac lipid hydroperoxide, serum total cholesterol, triacylglycerol, VLDL, LDL cholesterol, and atherogenic index as compared to C+PL. Growth hormone in standard-fed rats had no effects on cholesterol fractions. Triacylglycerol was unchanged in H+GH and H+PL rats. Total cholesterol and LDL were lower and VLDL was higher in H+GH rats than in H+PL (○ Fig. 1). Growth hormone in hypercaloric-fed conditions reduced serum AI and myocardial LH (○ Fig. 2).

Table 3 shows that cardiac protein and citrate synthase remained unchanged by the treatments. C+GH rats had higher myocardial PiDH activity than C+PL. H+PL rats had higher LDH and PiDH activities than C+PL. By comparing H+GH and H+PL rats, it was shown that GH reduced the PiDH activity, but had no effects on LDH and PFK.

Discussion

Obesity is a complex syndrome that is associated with a wide range of pathological conditions and the use of GH may be critical in improving lipid profile and cardiac function in obese condition. Growth hormone is an important peptide for maintenance of cardiovascular system [17,26]. Therefore the question that must be addresses is: what is the effect of GH on obesity-induced abnormalities?

To the best of our knowledge this is the first study that evaluated the effects of 2 mg/kg GH on some markers of metabolic pathways in cardiac tissue of young obese rats, as well their relationships with calorimetric parameters and oxidative stress. Recently, we have reported the effect of GH in myocardium of rats with congestive heart failure, a condition in which the cardiac metabolic change was irreversible [17]. However, the GH effects on obesity related metabolic alterations are not presently known.

Despite the macronutrient imbalance, miming a free living situation as seen in human obesity [1], our results demonstrated that the food consumption in both H+PL and H+GH groups were adequate to nutritional requirements and maintenance for adult rats [27]. No changes were found in myocardial protein (Table 3) demonstrating that the animals did not suffer from malnutrition. Over time, rats eating hypercaloric diet and drinking sucrose became obese [6,7,20], and ultimately exhibited a number of the physiological alterations seen in human obesity [1,14–16]. Despite the lower food consumption, the energy intake from chow was compensated by additional calories from the sucrose solution (Table 1), and H+PL rats had higher final body weight, body weight gain, BMI, and Lee index than C+PL.

Parameters	Groups			
	C+PL	C+GH	H+PL	H+GH
Initial body weight (g)	472.0 ± 43.5	472.0 ± 43.5	542.8 ± 43.7 ^a	542.8 ± 43.7 ^b
Final body weight (g)	488.2 ± 37.3	492.2 ± 25.8	575.2 ± 60.5 ^a	572.9 ± 60.1 ^b
Body weight gain (g)	16.3 ± 4.9	17.5 ± 2.6	35.8 ± 15.2 ^a	34.0 ± 4.8 ^b
Body mass index (g/cm ²)	0.70 ± 0.05	0.75 ± 0.04	0.84 ± 0.07 ^a	0.84 ± 0.05
Lee index (g/cm)	6.04 ± 0.40	6.54 ± 0.3	7.23 ± 0.6 ^a	7.38 ± 0.5 ^b
Food Consumption (g/day)	25.6 ± 8.1	31.1 ± 3.6	8.8 ± 2.2 ^a	9.0 ± 2.3 ^b
Liquid Consumption (ml/day)	60.0 ± 8.2	63.7 ± 14.3	60.0 ± 10.6	59.3 ± 9.4
Energy intake (kcal/day)	78.3 ± 9.4	93.3 ± 8.8 ^a	103.8 ± 17.7 ^a	91.41 ± 11.4

C+PL: control rats fed standard chow, water, and saline; C+GH: control rats fed standard chow, water, and GH; H+PL: rats fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline, and H+GH: rats fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH. Values are mean ± SD. ^a $p < 0.05$ vs. C+PL; ^b $p < 0.05$ vs. C+GH.

Table 1 General characteristics and nutritional parameters

Table 2 Calorimetric parameters

Calorimetric parameters		Groups			
		C+PL	C+GH	H+PL	H+GH
VO ₂ (ml/h)	Fed	199.1 ± 19.4	206.8 ± 46.2	206.0 ± 37.9	183.1 ± 54.7
	Fasting	214.1 ± 71.7	197.1 ± 56.1	213.13 ± 42.9	221.2 ± 34.3 ^a
VCO ₂ (ml/h)	Fed	145.9 ± 7.16	147.7 ± 3.6	146.6 ± 6.1	149.7 ± 0.4
	Fasting	136.1 ± 13.9 [*]	140.7 ± 0.2 [*]	141.1 ± 0.8	141.8 ± 0.7 [*]
RQ	Fed	0.74 ± 0.05	0.75 ± 0.10	0.73 ± 0.10	0.88 ± 0.20 ^{a,b}
	Fasting	0.7 ± 0.22	0.73 ± 0.11	0.68 ± 0.12	0.66 ± 0.11 [*]
RMR (kcal/h)	Fed	1.00 ± 0.05	1.17 ± 0.11 ^c	0.81 ± 0.06 ^c	0.75 ± 0.04 ^a
	Fasting	1.26 ± 0.17	0.94 ± 0.09	0.90 ± 0.05 ^c	1.02 ± 0.07 ^b
VO ₂ /body weight (ml/h/g)	Fed	0.43 ± 0.04	0.41 ± 0.09	0.36 ± 0.06 ^c	0.29 ± 0.08 ^{a,b}
	Fasting	0.46 ± 0.14	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.07	0.36 ± 0.05 [*]
VCO ₂ /body weight (ml/h/g)	Fed	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.001 ^c	0.26 ± 0.01 ^c	0.24 ± 0.001 ^{a,b}
	Fasting	0.29 ± 0.03 [*]	0.27 ± 0.001 ^{c*}	0.25 ± 0.001 ^{c*}	0.22 ± 0.001 ^{a,b*}
Carbohydrate oxidation (mg/min)	Fed	0.44 ± 0.2	0.95 ± 0.4 ^c	0.91 ± 0.3 ^c	1.98 ± 0.4 ^{a,b}
	Fasting	1.07 ± 0.6 [*]	Not detected ^{c*}	Not detected [*]	Not detected ^{c*}
Fat oxidation (mg/min)	Fed	2.26 ± 0.63	2.75 ± 1.85	2.52 ± 1.48	4.38 ± 0.93 ^{a,b}
	Fasting	4.47 ± 2.55 [*]	2.39 ± 1.15 ^c	3.05 ± 1.81	3.37 ± 1.48 ^a

C+PL: control rats fed standard chow, water, and saline; C+GH: control rats fed standard chow, water, and GH; H+PL: rats fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline, and H+GH: rats fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH

RMR: resting metabolic rate; RQ: respiratory quotient; VO₂: oxygen consumption; VCO₂: carbon dioxide production. Values are mean ± SD. ^ap < 0.05 vs. C+GH;

^bp < 0.05 vs. H+PL; ^cp < 0.05 vs. C+PL; ^{*}p < 0.05 Fasting vs. Fed

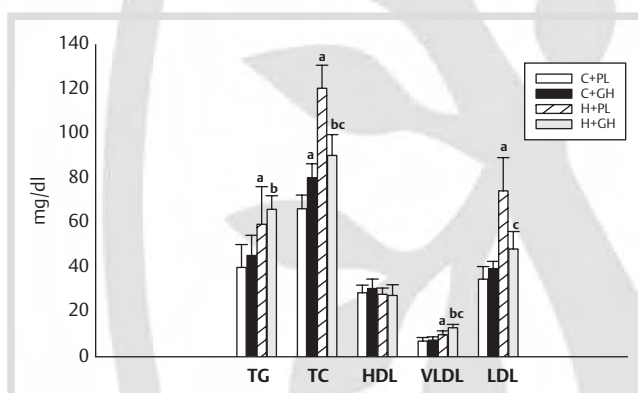


Fig. 1 Serum triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), and their fraction in rats fed standard chow, water, and saline (C+PL); fed standard chow, water, and GH (C+GH); fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water, and saline (H+PL); fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water, and GH (H+GH). ^ap < 0.05 vs. C+PL; ^bp < 0.05 vs. C+GH; ^cp < 0.05 vs. H+PL.

Interestingly, GH had no effects on morphometric parameters and body weight in both dietary conditions. Our results are in accordance with clinical studies of obese subjects that demonstrated very little or no evidence with respect to weight loss and fat reduction after GH treatment [26]. Some investigators have shown fat reduction in obese rats, however, treatment duration and GH dose, are relevant points to be considered [10,28]. Although different responses of GH treatment on food consumption have been described [29], GH alone did not influence food and liquid consumption (Table 1). On the other hand, despite the higher energy intake no significant changes were found in final body weight, BMI and Lee Index, comparing C+GH and C+PL rats. These observations suggested that factors other than energy intake play important role in morphometric parameters and body weight regulation, indicating that weight gain and morphometric changes can be viewed not only as the consequence of an initial positive energy balance, but also as the mechanism by which energy balance is eventually stored. In fact, there was

higher fed-energy expenditure in C+GH rats than in C+PL, indicating lower disposable energy to be stored in adipose tissue. Both fed and fasting RMR were lower in H+PL than in C+PL, but GH, despite no effects on fed RMR, significantly enhanced fasting RMR, demonstrating GH metabolic effects in obesity condition. Curiously, by analyzing carbohydrate oxidation, the effect of GH treatment was found to resemble to that of the hypercaloric diet, with higher fed and lower fasting carbohydrate oxidation, indicating reduced storage of hepatic glycogen when compared with control rats. Since the influence of the meal had essentially ended in the post absorptive state, the fasting carbohydrate oxidation gives an indication of the state of the glycogen stores [21].

Our data also suggested that when glycogen stores became saturated, the only way of disposing the additional excess of carbohydrate in H+PL rats was by fat synthesis, leading to increased de novo lipogenesis. H+PL rats had also depressed oxygen consumption/body weight (Table 2), similarly to the obese rats, in which reduced oxygen consumption was found [6].

Both fed carbohydrate and fed fat oxidation were higher in H+GH treated animals. However, the lower VO₂/body weight and VCO₂/body weight ratios, as well the higher fed RQ than C+PL indicated that the rate of carbohydrate oxidation exceeded fat oxidation in these animals. The change in fuel selection may be controlled by carbohydrate intake due to insulin secretion [30], but it is well known that GH can act as a diabetogenic hormone [8,13], thus inducing substantial changes on metabolic pathways for energy generation.

In fact the AI was significantly reduced in H+GH rats pointing to beneficial metabolic effects of GH in obesity condition (Fig. 2). H+PL rats had higher serum triacylglycerol than the others (Fig. 1), and this was related to lipogenic effect of high-sucrose intake [6], predominantly due to the fructose component of the sucrose [30]. During periods of high-sucrose intake, the hepatic tissue can convert glucose into fatty acids, from which triacylglycerols are made and transported to the blood stream by VLDL. It is widely accepted that enhanced TG is a risk factor for cardiovascular complications [31] and reflects infor-

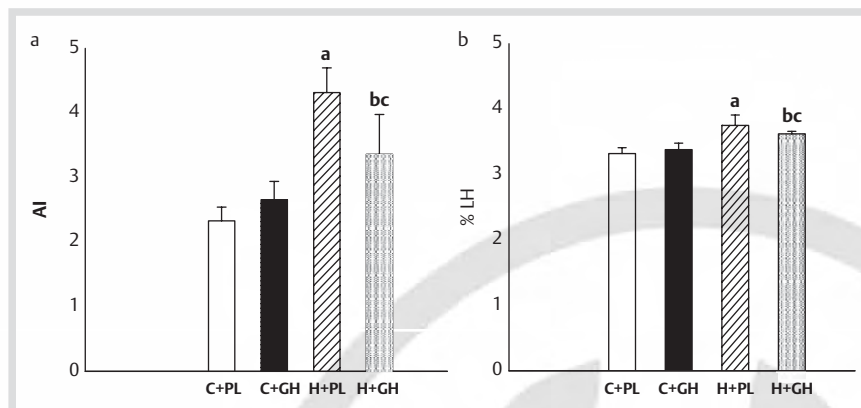


Fig. 2 a: Atherogenic index (AI); b: Cardiac lipid hydroperoxide levels (LH) in rats fed standard chow, water, and saline (C + PL); fed standard chow, water, and GH (C + GH); fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water, and saline (H + PL), and fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water, and GH (H + GH). ^ap < 0.05 vs. C + PL; ^bp < 0.05 vs. C + GH; ^cp < 0.05 vs. H + PL.

Cardiac determinations	Groups			
	C + PL	C + GH	H + PL	H + GH
Protein (mg/100 mg)	19.6 ± 0.5	20.5 ± 1.1	20.2 ± 1.0	20.5 ± 0.3
CS	163.7 ± 25.2	167.4 ± 26.7	171.1 ± 21.6	179.6 ± 29.3
LDH	646.2 ± 41.6	633.1 ± 40.7	715.7 ± 66.3 ^a	741.9 ± 61.7 ^b
PFK	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.4 ^b
PiDH	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.1 ^{b,c}

C + PL: control rats fed standard chow, water, and saline; C + GH: control rats fed standard chow, water, and GH; H + PL: rats fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline, and H + GH: rats fed hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH. Enzyme activities are expressed in nmol/mg protein.

CS: citrate synthase; LDH: lactate dehydrogenase; PFK: phosphofructokinase; PiDH: pyruvate dehydrogenase. Values are mean ± SD.

^ap < 0.05 vs. C + PL; ^bp < 0.05 vs. C + GH; ^cp < 0.05 vs. H + PL.

Table 3 Cardiac enzymes of rats

mation on LDL-composition, its size and density, since higher triacylglycerol indicates VLDL and chylomicron remnants abnormally interacting with HDL. Atherogenic process is initiated by oxidation of the lipids in LDL, and enhanced serum triacylglycerol is associated with smaller LDL, which becomes more susceptible to oxidative modification [16,31].

Several factors may be related to GH effects on AI. Growth hormone may increase hepatic LDL receptors, resulting in an accelerated rate of LDL clearance [32]. Growth hormone can affect lipid and carbohydrate metabolism due enhanced protein anabolism [26,33]. The relative rate and susceptibility of LDL to oxidation can be attributed to depressed amount of LDL protein and physical properties of the outer surface [34]. Therefore GH, due its anabolic protein property can increase LDL size, reduce AI, and the susceptibility for LDL oxidation. Finally, GH significantly enhanced carbohydrate and fat oxidation in hypercaloric fed condition (Table 2).

Judging from our experimental results the hypercaloric-diet as well GH administration effects were, at least in part oxidant-antioxidant mediated. Cardiac lipid hydroperoxide was significantly enhanced in obese rats. Lipoperoxidation is important because of its consequences for energy metabolism, causing impaired adenosine triphosphate synthesis for myocardial contractile function. Therefore GH, reducing the myocardial oxidative stress as demonstrated by cardiac LH concentration (● Fig. 2), improved myocardial metabolism in obese conditions.

The enhanced myocardial LDH activity in H+PL rats indicated that pyruvate produced by glycolysis is not readily oxidized in the mitochondria but, rather, is reduced to lactate in the cytosol. The maintenance of CS activity, while LDH and PiDH were enhanced in obese rats clearly demonstrated inadequate control of metabolic pathways in obese conditions. Despite the maintenance

of fat oxidation, the fed-carbohydrate oxidation was enhanced in H + PL rats (Table 2). Pyruvate dehydrogenase is the key enzyme that regulates the flux of glucose intermediaries in aerobic respiration and CS for the control of the flux of metabolites through the tricarboxylic acid cycle [25]. In normal heart, a high fat environment promotes fatty acid oxidation, which in turn inhibits glucose oxidation [5]. Substantial evidence suggested that glucose utilization is critical to maintain contractile function when the heart is stressed, as occurred in hypercaloric fed rats. At the same time, the importance of dietary sucrose in the development of glucotoxicity in heart needs to be considered, particularly when it is related to states of high fat supply such as obesity.

Fatty acids constitute the main source of energy for the myocardium and fat oxidation was higher in H + GH than in H + PL rats (Table 2). This indicated that the enhanced acetyl-CoA generation from fatty acid oxidation was responsible for the lower PiDH activity in these animals, as compared to H + PL. Note that H + GH rats had the highest fed-carbohydrate oxidation (Table 2), despite the maintenance of myocardial LDH and PFK activities as compared to H + PL rats. Glycolysis preferentially serves energy channeling to sarcolemmal membranes (SL), where glucose transport into cells occurs, by providing this readily available substrate for glycolytic enzymes bound to sarcolemmal molecular complexes [35]. The SL/glycolytic pathways represent low capacity, but high specificity modules of the integrated metabolic network of a cardiac myocyte, as an adaptive mechanism in obesity condition.

Growth hormone maintained the normal myocardial LH and LDH activity in control fed conditions (● Fig. 2, Table 3), but significantly enhanced PiDH, indicating improvement of energy metabolism, as compared to C + PL. The fed carbohydrate oxidation was higher and the fasting fat oxidation was lower com-

pared with the control C+PL (Table 2), indicating adequate insulin response and adequate metabolic control. Experimental and clinical studies have shown that stimulating glucose oxidation has antischemic effects and can improve cardiac function and efficiency [5].

In conclusion, the present study brought new insights of GH effects on obesity related cardiovascular damage demonstrating for the first time that GH regulated cardiac metabolic pathways, enhanced energy expenditure, depressed the atherogenic index, and improved the lipid profile in obesity condition. Growth hormone in standard fed condition also offered promising therapeutic value to enhance pyruvate-dehydrogenase activity, and the glucose oxidation in cardiac tissue, thus optimizing myocardial energy metabolism.

Affiliations

¹ Post Graduation Course, Department of Clinical and Cardiology, School of Medicine, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

² Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biological Sciences, São Paulo State University, UNESP, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil

³ Department of Physiotherapy, Faculty of Sciences and Technology, São Paulo State University, UNESP, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

References

- Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev* 2006; 27: 750–761
- Diniz YS, Burneiko R, Seiva F, Galhardi C, Mani F, Novelli ELB. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol* 2008; 124: 92–99
- Owen CG, Whincup PH, Orfei L, Chou QA, Rudnicka AR, Wathern AK, Kaye SJ, Eriksson JG, Osmond C, Cook DG. Is body mass index before middle age related to coronary heart disease risk in later life? Evidence from observational studies. *Int J Obes* 2009; 7: 1–12
- Carvajal K, Hafidi M, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R. Structural and functional changes in heart mitochondria from sucrose-fed hypertriglyceridemic rats. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1709: 231–239
- Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 2007; 101: 335–347
- Novelli ELB, Santos P, Assalin H, Souza G, Rocha K, Ebaid G, Seiva F, Mani F, Fernandes A. N-acetylcysteine in high sucrose induced obesity: energy expenditure, metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res* 2009; 59: 74–79
- Yue TL, Bao W, Gu JL, Cui J, Tao L, Ma XL, Ohlstein EH, Jucker BM. Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia reperfusion-induced myocardial injury. *Diabetes* 2005; 54: 554–562
- Shadid S, Jensen MD. Effects of growth hormone administration in human obesity. *Obes Res* 2003; 11: 170–175
- Mekala KC, Tritos NA. Effects of recombinant growth hormone therapy in obesity in adults: A metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 130–137
- Johansen T, Laurino C, Barreca A, Malmjöf K. Reduction of adiposity with prolonged growth hormone treatment in old obese rats: effects on gluco handling and early insulin signaling. *Growth Horm IGF-I Res* 2005; 15: 55–63
- Johannsson G, Mårin P, Lönn L, Ottosson M, Stenlöf K, Björntorp P, Sjöström L, Bengtsson BA. Growth hormone treatment of abdominally obese men reduces abdominal fat mass, improves glucose and lipoprotein metabolism, and reduces diastolic blood pressure. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 727–734
- Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 2007; 101: 335–347
- Laron Z. Insulin – a growth hormone. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114: 11–16
- Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J* 2007; 15: 457–467
- Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav* 2009; 96: 1–5
- Souza GA, Ebaid GX, Seiva FRF, Rocha KHR, Galhardi CM, Mani F, Novelli ELB. N-acetylcysteine in Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 11: 1–7
- Seiva FRF, Ebaid GMX, Castro AVB, Okoshi K, Nascimento A, Rocha KKH, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli ELB. Growth Hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats. *Growth Horm IGF-I Res* 2008; 18: 275–283
- Pérez-Romero A, Amores A, Salame F, Ariznavarreta C, Tresguerres JA. Efectos de la administración de rhGH en ratas macho viejas. *Endocrinol Nutr* 1999; 46: 31
- Castillo C, Cruzado M, Ariznavarreta C, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Cachoeiro V, Tresguerres JA. Effect of recombinant human growth hormone on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats. *Biogerontology* 2005; 6: 303–312
- Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007; 41: 111–119
- Labayen I, Forga L, Martinez JA. Nutrient oxidation and metabolic rate as affected by meals containing different proportions of carbohydrate and fat, in healthy young women. *Eur J Nutr* 1999; 38: 158–166
- Castelli WP, Abbot RD, McNamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circ* 1983; 67: 730–734
- Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275
- Jiang ZY, Woollard A, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe³⁺ in the presence of xylenol orange. *Lipids* 1991; 26: 853–856
- Bass A, Brdicka PE, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* 1969; 10: 198–206
- Rasmussen MH. Obesity, growth hormone and weight loss. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316: 147–153
- Bieri JG, Stoenband GS, Briggs GM, Phillips RW, Woodand JC, Knpha JJ. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of nutrition Ad Hoc Committee on Standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977; 107: 1340–1348
- Malmjöf K, Din N, Johansen T, Pedersen S. Growth hormone affects both adiposity and voluntary food intake in old and obese female rats. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 121–128
- Roberts TJ, Azain MT. Effect of somatotropin on rate and composition of gain and feed intake in young pituitary intact female rats. *Growth Dev Aging* 1995; 59: 3–13
- Stortelien LH, Kraegen EW, Jenkins AB. Effects of sucrose vs. starch diets on in vivo insulin action thermogenesis and obesity in rats. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 420–427
- Brizzi P, Tonolo G, Carusillo F, Malaguarnera M, Maioli, Musumeci S. Plasma lipid composition and LDL oxidation. *Clin Chem Lab Med* 2003; 4: 56–60
- Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson J, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6983–6987
- Hjalmarson A, Isaksson O, Ahrén K. Effects of growth hormone and insulin on amino acid transport in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1969; 217: 1795–1802
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668–676
- Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosswalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 2001; 89: 153–159

CAPÍTULO 3

**RESPOSTA CALORIMÉTRICA, MORFOMÉTRICA E
METABÓLICA CARDÍACA AO HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO EM RATOS OBESOS E
CONSIDERADOS VELHOS.**

RESUMO

O envelhecimento populacional mundial é considerado um processo relativamente novo na história da humanidade e está associado a melhorias na área de prevenção e tratamento na saúde pública, bem como à diminuição da taxa de fertilidade, elevando rapidamente assim, o número de pessoas com mais de 60 anos em vários países ao redor do mundo (ACEVEDO, 1998). Embora esse aumento possa ser visto como um ponto positivo, ainda é preciso alcançar também melhorias na qualidade de vida entre as pessoas idosas. Comorbidades e complicações advindas de processos que acompanham o envelhecimento, tais quais, diabetes, sobrepeso e obesidade, hipertensão arterial, doenças neurodegenerativas e principalmente complicações cardiovasculares, ainda são problemas, que além de onerarem o sistema único de saúde, elevam a taxa de mortalidade na população senil.

GH, ou hormônio de crescimento, produzido e secretado na hipófise anterior, atua direta ou indiretamente, via IGF-I (hormônio de crescimento insulina-símile) produzido principalmente no fígado, levando ao crescimento longitudinal ósseo, muscular e das cartilagens. O GH também é um importante mediador de algumas vias metabólicas, como a oxidação lipídica. Em relação ao metabolismo dos carboidratos, o GH apresenta efeitos antagônicos aos efeitos clássicos da insulina, sendo por muitos, considerado um hormônio diabetogênico (COPELAND et al, 1990; HAJIMA et al, 2005).

A partir do trabalho pioneiro realizado por Everitt e Cavanagh (1965), demonstrando um retardo do processo de envelhecimento em ratos hipofisectomizados, muita atenção tem sido dada aos hormônios pituitários para se entender o processo de envelhecimento. Alguns hormônios, como a prolactina, hormônios tireoideanos e sexuais, como a deidroepiandrosterona têm sido bastante estudados (BROWN-BORG, 2007). Os hormônios do eixo somatotrófico, GH e IGF-I

vêm recebendo atenção especial e inclusive já foi proposto o GH como o “hormônio da juventude”!

Durante o envelhecimento há redução nos níveis plasmáticos de GH e/ou diminuição da secreção fisiológica deste, bem como uma diminuição dos níveis circulantes de IGF-I. Curiosamente modelos experimentais de roedores que não produzem GH, como camundongos “anões” das linhagens *Ames* e *Snell*, apresentam um aumento na expectativa de vida, o que aumenta ainda mais o interesse no entendimento deste hormônio no processo de envelhecimento.

A obesidade, um problema crescente de saúde pública, também pode estar acompanhada de alterações endócrinas e metabólicas, semelhantes ao que ocorre no envelhecimento; diminuição na secreção de GH é uma delas (SHADID, 2003). Alguns trabalhos demonstraram que o tratamento ou a reposição de GH reduziu fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuindo os depósitos de gordura visceral, aumentando a massa muscular corpórea e melhorando o perfil lipídico (CUTTICA et al, 1997; ANGELOPOULOS et al, 1998; DESPRES et al, 2001). Doenças cardiovasculares representam uma das principais causas associadas à morbimortalidade em pessoas obesas e/ou idosas e (HILL, 2006), no entanto, os mecanismos por trás desses processos ainda são passíveis de discussões. O GH também desempenha importante papel no desenvolvimento e manutenção da saúde cardiovascular. Isto fica demonstrado em pacientes com deficiência deste hormônio e que desenvolvem precocemente arteriosclerose e doença coronariana e, além disso, apresentam alta taxa de mortalidade devido a problemas cardíacos (ROSEN; BENGTTSSON, 1990; CASTILLO et al, 2005).

Levando-se em conta o risco aumentado para problemas cardíacos encontrados tanto no envelhecimento como oriundos da obesidade e, o papel indiscutível que o GH apresenta para a manutenção da homeostase orgânica, o presente trabalho teve

como objetivo determinar os efeitos do tratamento com GH sobre os fatores de risco freqüentemente encontrados na obesidade e no envelhecimento.

Para esse estudo 32 ratos Wistar machos, com 510 dias de vida, foram divididos inicialmente em dois grupos (n=16). O grupo C, considerado controle, recebeu ração padrão (Purina Labina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais do grupo hipercalórico (H) receberam ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol e solução aquosa de sacarose 30% na água de beber. O objetivo desta dieta foi induzir alterações metabólicas semelhantes às aquelas encontradas na obesidade. Esta dieta foi mantida até o final do experimento.

Após 45 dias, os animais do grupo C e H foram divididos em dois subgrupos:

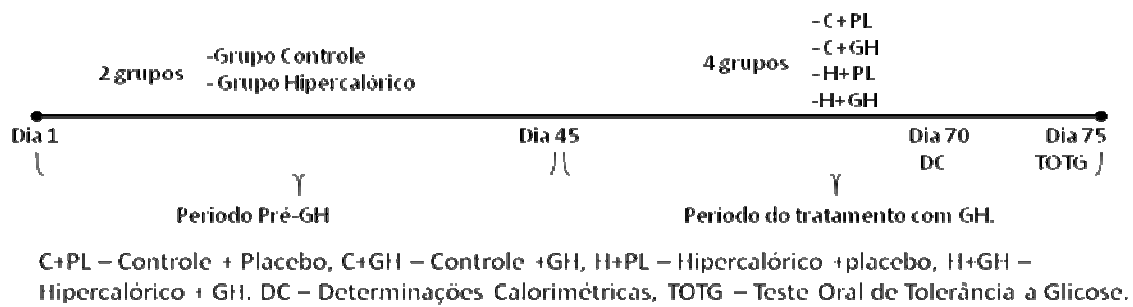
C+GH (n=8) - mantidos com ração padrão e recebendo GH na dose de 2mg/kg, sc, cinco dias da semana (PÉREZ-ROMERO et al.,1999; CASTILLO et al., 2005);

C+PL (n=8) - mantidos com ração padrão, recebendo solução salina (NaCl, 0,9%), sc, cinco dias da semana;

H+GH (n=8) - mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol, solução aquosa de sacarose 30% na água de beber e recebendo GH na dose de 2mg/kg, sc, cinco dias da semana;

H+PL (n=8) - mantidos com ração contendo elevada concentração de sacarose e colesterol, solução aquosa de sacarose 30% na água de beber e recebendo solução salina (NaCl, 0,9%), sc, cinco dias da semana.

A duração do tratamento com o GH foi de 30 dias, totalizando 75 dias de experimento. A figura abaixo mostra o delineamento experimental do estudo.



Ao final do experimento animais do grupo C+GH e H+PL apresentaram características semelhantes como maior IMC, índice de Lee, depósitos de gordura, índice de adiposidade, triacilglicerol sérico e cardíaco, bem como aumento do hidroperóxido de lipídio miocárdico, um indicador de estresse oxidativo. O tratamento com GH em animais que receberam dieta hipercalórica elevou a relação taxa metabólica de repouso/peso corporal, consumo de O₂, oxidação lipídica e a concentração de LDL- colesterol, comparado ao grupo H+PL. O metabolismo da glicose também foi alterado no grupo H+GH, evidenciando uma possível intolerância à glicose e/ou resistência a insulina, apontando para efeitos indesejáveis do tratamento com GH. Por sua vez, o consumo de dieta hipercalórica aumentou a atividade das enzimas piruvato desidrogenase e fosfofrutoquinase-1, enzimas reguladoras da via glicolítica. Essa elevação pode estar associada ao maior conteúdo de glicose na dieta ofertada.

Os dados inéditos encontrados neste estudo nos permitem apontar o tratamento com 2mg/kg de GH como sendo prejudicial para animais obesos e considerados velhos, uma vez que houve prejuízo nos parâmetros calorimétricos, no perfil lipídico e estresse oxidativo miocárdico. Desta forma, o GH não seria um bom candidato a um coadjuvante para diminuição dos fatores de riscos encontrados no envelhecimento.

Calorimetry, morphometry and cardiac metabolic response to growth hormone treatment in obese and aged rats.

Fábio R.F. Seiva, Ethel L.B. Novelli*

*Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biological Sciences, São Paulo State University, UNESP, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil.

GROWTH HORMONE, OBESITY AND AGING

Describing: This study investigated the effects of growth hormone therapy on energy expenditure, lipid profile, oxidative stress and cardiac energy metabolism in aging and obesity conditions.

* Corresponding author: Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Sao Paulo State University, UNESP, 18618-000, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Tel: +55-14-38116255; fax: +55-14- 38153744.

E-mail address: drno@uol.com.br [E.L.B. Novelli]

Disclosure summary: The authors declare that there is no conflicting of interest.

Abstract

Life expectancy is increasing in world population and with it, the incidence of public health problems such as obesity and cardiac alterations. Because growth hormone (GH) concentration is referred to be decreased in aging conditions, a question must be addressed: what is the effect of GH on aging related adverse changes? To investigate the effects of GH on cardiac energy metabolism and its association with calorimetric parameters, lipid profile and oxidative stress in aged and obese rats, initially 32 male *Wistar* rats were divided into two groups (n=16):(C) given standard-chow and water;(H) given hypercaloric-chow and receiving 30% sucrose in its drinking water. After 45 days, both C and H groups were divided into two subgroups (n=8):(C+PL) standard-chow, water and receiving saline subcutaneously;(C+GH) standard-chow, water and receiving 2 mg/kg/day rhGH subcutaneously;(H+PL) hypercaloric-chow, 30% sucrose, receiving saline subcutaneously;(H+GH) hypercaloric-chow, 30% sucrose, receiving rhGH subcutaneously. After 30 days, C+GH and H+PL rats had higher body mass index, Lee-index, body fat content, percent-adiposity, serum triacylglycerol, cardiac lipid-hydroperoxide and triacylglycerol than C+PL. Energy-expenditure (RMR)/body weight, oxygen consumption and fat-oxidation were higher in H+GH than in H+PL. LDL-cholesterol was highest in H+GH rats, whereas cardiac pyruvate-dehydrogenase and phosphofructokinase activities were higher in H+GH and H+PL rats than in C+PL. In conclusion, the present study brought new insights on aging and obesity, demonstrating for the first time that GH therapy was harmful in aged and obesity conditions, impairing calorimetric parameters, lipid profile and oxidative stress. GH was disadvantageous in old rats, having undesirable effects on cardiac energy metabolism.

Key-words: growth hormone, obesity, aging, cardiac energy metabolism

Introduction

Aging world population has been considered as a relatively new process for the mankind history [1]. Long life span and declining fertility rates are among the responsible causes for the faster growth of people over 60 years in most of countries. Although public health policies and socioeconomic development must act as a relevant background, there are still several concerns about life quality that should be addressed. Diabetes, obesity and overweight, high blood pressure, neurodegenerative diseases and, mainly, cardiovascular complication are considered serious health problems that follow aged people.

Practically all tissues can suffer from the biochemical and cellular alterations of aging [2]. Since the pioneer Everitt and Cavanagh [3] work, demonstrating the retardation of the aging process in hypophysectomized rats, much attention has been drawn to pituitary hormones for life span regulation. Prolactin, thyroid, dehydroepiandrosterone and sexual hormones have been widely studied [4]. Beyond these hormones, somatotrophic axis has received special attention.

Growth hormone (GH) acts directly or indirectly via IGF-I (insulin simile growth factor), produced mainly in the liver, driving the bone, muscle and cartilage growth. GH can also acts in some metabolic pathways, as lipid oxidation. Related to glucose metabolism, GH acts opposing insulin classic effects. Aging is associated with reduction of GH plasmatic levels and/or spontaneous GH secretion, as well as diminished IGF-I circulating levels [5,6]. Lack circulating GH rodents, such as Ames and Snell dwarf mice had life span extension [4].

Similarly to aging, obesity, a growing public health problem, can also be accompanied by some endocrine and metabolic abnormalities, such as decreased serum GH levels [7]. Some studies have showed that GH replacement or treatment reduced visceral fat depots [8], augmented muscle mass [9] and improved lipid profile [10], thus reducing cardiovascular risks. Cardiac damage represents one of the main health problems associated with aging and obesity-induced morbidity and mortality [11], but the mechanisms that are triggered for this disease are not completely clear.

It is known that GH and IGF-I have effects not only for the somatic longitudinal growth [12], but also act on the cardiovascular system [13]. This was demonstrated in GH deficient patients, who develop early atherosclerosis and show high morbidity-mortality due to cardiac problems [14].

Since the somatotrophic axis influences the cardiovascular system, energetic metabolism and lipid oxidation, the reduction found in this control center, could, at least in part, be responsible for aging and obesity deleterious effects. However, neither the precise mechanism

of, nor whether GH can ameliorate the metabolic changes associated with aging and obesity have been recognized.

Taking into account the aging-induced adverse effects, as well the biochemical alterations found in obesity condition, the present study is an attempt to investigate whether obesity could be reproducible in old rats fed a hypercaloric diet. The major purpose of this study was to verify the effects of GH administration on risk factors for cardiac disease, frequently found in aging and obesity. Therefore, we used a rat model to study an unresolved issue in the field of obesity and aging that is to determine whether GH treatment has effects on energy expenditure, lipid profile, oxidative stress and cardiac energy metabolism, in old and obese rats.

Material and Methods

Obesity induction and experimental treatment

All experiments and procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health and were approved by the Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. Third two male Wistar rats, 510 days of age, were individually housed in polypropylene cages in an environmentally controlled clean-air room with a temperature of $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, a 12 h light-dark cycle and a relative humidity of $60 \pm 5\%$. Initially, the animals were randomly divided into two groups. Taking into account the hormonal influences in female, we used only male rats [15]. The control (C, $n=16$) received water *ad libitum* and standard rodent chow (3074 SIF, Purina Ltda., Campinas, SP, Brazil), containing (by weight) 19.90% protein, 30.03% carbohydrate, 3.80% fat, 13.36% fibre, and 3.00 kcal/g of metabolizable energy. The hypercaloric (H, $n=16$) group received a hypercaloric chow and 30% sucrose in drinking water *ad libitum*. In order to induce obesity the hypercaloric chow was obtained mixing 203,7g sucrose and 88,26g of soy oil to 1000 g of a previously triturated standard chow. Dietary ingredients were homogenized in 60°C warm distilled water and the homogenate was used to prepare the pellets. The proportions of dietary protein, carbohydrate and fat were determined by direct analysis [16]. The hypercaloric chow contained (by weight) 18.00% protein, 47.59% carbohydrate (20.37% sucrose), 11.41% fat, 5.43% fibre and 3.64 kcal/g of metabolizable energy. Food intake and drinking solutions consumption were evaluated daily at the same time (9-10h), as the difference between food and drinking solution given and the leftover. Body weights were determined once a week.

To study the GH effects on obesity, after 45 days of dietary treatments, both C and H groups were then randomly divided into two subgroups (n=8/group): (C+PL) control, receiving standard chow, water and saline infusion subcutaneously (NaCl 0,9%); (C+GH) remained eating standard chow, receiving water and 2mg/kg/day rhGH; (H+PL) continued to eat hypercaloric diet, given 30% sucrose in its drinking water and receiving saline; (H+GH) continued to eat hypercaloric diet, given 30% sucrose in its drinking water and receiving rhGH. 2mg/kg/day of rhGH (Hormotrope, 4UI, Bergamo, Sao Paulo, Brazil) was daily injected, subcutaneously, during 30 days [17], totalizing 75 days of experimental period. The dose, the application form and the treatment duration were selected based on studies showing GH effects on serological and morphometric parameters in rats [13, 17, 18, 19]. Since GH secretion occurs in a pulsatile manner we made sure to inject GH doses at the same time throughout treatment to mimic the release that occurs *in vivo*. The food intake, sucrose consumption, caloric value of rodent chow and sucrose (4 kcal/g) were used to obtain total energy intake (EI, kcal/day) = (mean food consumption per day (g) x dietary energy) + (amount of sucrose intake per day (g) x 4). The body mass index (BMI)(g/cm²)= body weight/total length²; Lee index (g/cm) = $\sqrt[3]{\text{body weight/total length}}$ [20,21]; retroperitoneal, epididymal and visceral fat depots were also determined, as well the adiposity index (%) = total body fat content/body weight [22].

Indirect calorimetry

After 25 days of GH treatment (70 days of the experimental period), the rats were fasted overnight (12-14h) and placed into metabolic chambers (airflow=1.0 l/min) of a computer-controlled indirect calorimeter (CWE, Inc, St. Paul, USA). Respiratory quotient (RQ) and energy expenditure, namely resting metabolic rate (RMR) were measured using a respiratory-based software program (software MMX, CWE, Inc., USA). Average oxygen consumption (VO₂) and average carbon dioxide production (VCO₂) were integrated over periods of 15min. Carbohydrate and fat oxidation were calculated from the non-protein oxygen consumption and the amount of oxygen consumed per gram of substrate oxidized [23].

Serum and myocardial analysis

After 30 days of GH administration (75 days of total experimental period), rats were fasted overnight (12 to 14h) and submitted to the oral glucose tolerance test (OGTT). So, glucose was given (3g /kg body weight), as a 20% aqueous solution. Blood glucose levels were measured before the glucose administration and at 30, 60 and 120 min after the glucose

ingestion [24]. Blood was taken from a tail vein and glucose concentrations were determined by an automatic glucose analyzer (Boehringer Mannheim, Eli Lilly Ltda, São Paulo, Brazil). After the OGTT animals were anaesthetized with 0.1ml ip of 1% sodium pentobarbital for measurement of the abdominal circumference, body length [15], and were sacrificed by decapitation. Total blood was collected by a funnel into a centrifuge tube and allowed to clot to obtain the serum. Serum samples were collected for IGF-I measurements (rat/mouse IGF-I ELISA), IDS AC18F1 – Immunodiagnostic Systems Ltd], triacylglycerol, cholesterol and its fractions determinations (test Kit CELM, Modern Laboratory Equipment Company, Sao Paulo, Brazil). The atherogenic index (AI) was determined as total cholesterol/HDL ratio [25]. The heart was rapidly removed and weighed. The left ventricle was separated and stored at -86°C for subsequent analysis. For total protein [26] and enzymes determinations, left ventricle samples of 200 mg were homogenized in 5 mL of a cold 0.1M phosphate buffer, pH 7.4. Tissue homogenates were prepared in a motor driven Teflon glass Potter Elvehjem, tissue homogenizer (1 min, $100\times g$). The homogenate was centrifuged at $10000\times g$ for 15 min., and the supernatant was used for determination of several cardiac key metabolic enzymes. Cardiac lipid hydroperoxide (LH) was determined with 100 μL of sample and 900 μL of a reaction mixture containing 0.25 mM of FeSO_4 , 25 mM of H_2SO_4 , 0.1 mM of xylenol orange, and 4 mM of butylated hydroxytoluene in 90% (v/v) methanol. The mixtures were incubated for 30 min at room temperature before measurement at 560 nm [27]. Cardiac energy metabolism was assessed by lactate dehydrogenase (LDH; E.C.1.1.1.127), citrate synthase (CS; E.C.4.1.3.7), phosphofructokinase (PFK; E.C.2.7.1.11) and pyruvate dehydrogenase (PiDH; E.C. 1.2.1.51) activities [28]. Enzyme activities were performed at 25°C using a microplate reader ($\mu\text{Quant-MQX 200}$ with Kcjunior software to computer system control, Bio-Tec Instruments, Winooski, Vermont, USA). The spectrophotometric determinations were performed in a Pharmacia Biotech spectrophotometer with temperature controlled cuvette chamber (UV/visible Ultrospec 5000 with Swift II Applications software to computer system control, 974213, Cambridge, England, UK).

Statistical Analysis

Analysis of variance for two variables (Two Way-ANOVA) was used to analyze the effects of diet and GH. Comparison between the means was performed by Tukey test, with $p \leq 0.05$ (SigmaStat software for windows, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Results

Data before GH treatment

The effects of 45 days' hypercaloric-diet ingestion were achieved in rats of H group (data not shown). These animals showed higher final body weight, body weight gain, energy intake and serum triacylglycerol concentration than C group. As previously found [19], the H group had also lower RMR/body weight, VO_2 /body weight and VO_2 /body surface, characterizing obesity.

Data after GH treatment

General characteristics and nutritional parameters

C+GH group had higher abdominal circumference, BMI, Lee index and percent adiposity than C+PL. H+PL rats, compared with C+PL, had higher final body weight, abdominal circumference, BMI, Lee index, energy intake, percent adiposity, as well lower food consumption. GH treatment in H rats did not alter any of these parameters. IGF-1 was higher in C+GH and H+GH than in C+PL. No changes were found in IGF-1 comparing H+GH and H+PL (Table 1).

Calorimetric data

H+PL group had lower VO_2 /body weight, VCO_2 /body weight and VO_2 /surface area than C+PL. H+GH group compared with H+PL, showed reduced RQ, VCO_2 /body weight and augmented RMR/body weight, VO_2 /body weight, VO_2 /surface area and fat oxidation. C+GH rats had lower VCO_2 /body weight ratio than C+PL (Table 2).

Oral glucose tolerance test

Mean fasting blood glucose was comparable in all four groups. For C+PL and H+PL groups, the glucose level peaked at 30 min, and dropped thereafter. For C+GH and H+GH the glucose level peaked at 60 min. Basal blood glucose levels after OGTT for C+GH and H+GH rats were higher than the respective fasting glucose levels. Serum glucose was higher in H+GH than in C+GH after the OGTT (Fig. 1).

Fat content, serum and myocardial analysis

H+PL rats had higher total, visceral, retroperitoneal and epididymal fat depots than C+PL. C+GH and H+PL groups, as well H+GH and H+PL groups did not differ in relation to fat depots (Fig. 2).

GH treatment enhanced the TG and VLDL-cholesterol in C+GH group. H+PL group had higher TG, total cholesterol, VLDL and LDL concentrations than C+PL. H+GH rats had lower TG and higher LDL concentrations than H+PL (Fig. 3). The atherogenic index was only higher in H+GH group than in C+GH (Fig. 4-A). Cardiac lipid hydroperoxide was higher in C+GH and H+PL groups than in C+PL (Fig. 4-B).

There were no significant changes in cardiac protein concentration, as well in citrate synthase and lactate dehydrogenase activities among the four groups (Table 3). There was enhanced cardiac TG concentration in C+GH and H+GH groups, compared with C+PL and H+PL respectively. H+PL rats had higher pyruvate dehydrogenase and phosphofructokinase activities than C+PL.

Discussion

It is already well established that obesity occurs when there is an alteration in energy balance, e.g., when energy intake exceeds energy expenditure. In young rats, this deregulation can be opposed by increased metabolic rate and/or by loss of energy in the form of heat [29]. In aged rodents or humans, however, these compensatory mechanisms may fail, and a spontaneous obesity can occurs. Aging can be accompanied by decreased GH secretion, suggesting a relation between these two processes. Therefore, the question that must be addressed is: what is the GH effect on metabolic and calorimetric parameters, as well on myocardial oxidative stress in a reversible-obesity aged rat model?

Recently we have reported that, over-time young rats consuming hypercaloric diet (HD) plus sucrose 30% in drinking water shared some metabolic alterations found in obesity, such as higher body weight, body weight gain, dyslipidemia, and cardiac metabolic changes [24], and GH treatment improved lipid profile and reduced the cardiac damage in HD condition [19]. However, whether GH can alleviate the effects of HD induced obesity in old rats is not presently known.

The expected decline of GH secretion that follows aging, named somatopause [30] is implicated, directly or indirectly, with physiological changes. After 30 days of GH treatment there was a positive response to the GH applications, as seen by the increased IGF-I concentration in C+GH group (Table 1). H+PL rats showed higher IGF-I concentration, when

compared with their controls. An augmented production of IGF-I can result in an indirect reduction of GH secretion, by negative feedback mechanism. Adipose tissue can contribute to IGF-I production [31,32], or to decreased GH secretion, indirectly, via several proteins secreted by adipocytes and liberated to the bloodstream [33]. Taking into account the accumulation of fat depots in H groups (Fig.3) it is reasonable pointing to the fat tissue as an active site of IGF-I production. Anyhow even extra doses of GH could not be enough to increase IGF-I levels, as seen in H+GH rats.

As found in young rats [19], after 45 days of HD consumption, aged rats showed similar features [data before GH treatment] found in obesity. Hypercaloric fed rats had lower food consumption than the controls groups (Table 1), which was associated with the energy amount of HD (average of 3.64 kcal/g) compared with the control diet (average 3.0 kcal/g). There was also a compensatory effect of additional calories from the sucrose solution in these animals. Since cardiac protein did not differ among groups, it can be assumed that food consumption in both H+PL and H+GH groups was adequate to nutritional requirements for adult rats [15,21,34].

Note that all of the fat depots were higher in hypercaloric fed animals, and our results demonstrated that GH had no effects on fat content and adiposity index comparing H+GH and H+PL. Castillo et al [13] using the same GH dose found beneficial effects of GH on body composition. The differences between our results and the ones of Castillo et al. [13], such as reduced fat depots and body weight, are probably due to the HD consumption, since in the last study rats fed a normal rat chow. Once the influence of the meal had essentially ended in the postabsorptive state, the fasting-RQ value gives an indication of the state of the body glycogen stores [35]. Therefore the not detected carbohydrate oxidation was consistent with the absence of intracellular glycogen even in hypercaloric fed rats. GH is considered a diabetogenic hormone opposing insulin classic effects [5,6]. In fact, GH treated rats in both dietary conditions had high blood glucose after the OGTT, indicating decreased glucose utilization and/or glucose intolerance (Fig. 1). GH excess leads to deterioration of glucose metabolism as a consequence of the lipolytic effect of GH, resulting in increased oxidation of lipid substrates [36]. Despite this lipolytic effect, 2 mg/kg GH was insufficient to reduce fat depots in old rats. The efficacy of GH treatment, to reduce body fat mass is still a controversy subject, but the enhanced fat storage in GH treated rats (Fig.2) indicated that factors other than energy intake play important role in fat storage regulation.

Our results clearly point to harmful effects of HD consumption. Since high sucrose diet is very lipogenic, long periods of high-carbohydrate intake induces the hepatic tissue to convert

glucose into fatty acids, from which triacylglycerol are synthesized and transported to the blood stream as very low density lipoprotein cholesterol [23], thus explaining the enhanced TG and VLDL levels in H+PL rats. Curiously, GH increased TG concentrations in C+GH rats and some factors may have contributed to this effect. Studies relating GH and lipoprotein metabolism [37] demonstrated that GH stimulates hepatic VLDL [38] and apoE24 [39] secretion, and may influence the ratio between apoB-100 and apoB-48 through stimulation of apoB mRNA editing in rats [40]. Due to GH lipolytic effect there is an increase in plasma free fatty acid (FFA). Therefore, plasma free fatty acids rather than quilomicrons were the major precursors of TG and of VLDL in C+GH and H+GH animals (Fig.3). GH induced dyslipidemia may be also associated with oxidative stress.

Emerging data on the “antioxidant hypothesis” have indicated that reactive oxygen species [ROS] affect cellular signals, damaging cellular DNA, protein and lipids [4, 23]. ROS react with protein thiol moieties to produce a variety of sulphur oxidation states, thus diminishing the cellular uptake of lipids from the blood, enhancing LDL concentrations and the atherogenic index (Fig. 4-A). GH/IGF-1 axis has been reported by several authors as an important regulator of ROS generation. GH over expression enhanced superoxide radicals and lipid peroxidation [41], and perhaps adaptively diminished antioxidant defenses. On the other hand, experimental models of mice that do not produce or are GH resistant exhibit enhanced antioxidant defense capacity with elevated antioxidant enzymes [4]. Ames dwarf mice and Snell dwarf mice lack growth hormone live much longer than their normal siblings, exhibit many symptoms of delayed aging [42] and it can be partially explained by reduced oxidative damage. So it is not surprisingly the inability of GH to reverse the diet-induced increase in LH levels and explains, at least in part, the elevated myocardial LH levels, found in C+GH group (Fig. 4-B).

Concerning to cardiac tissue the maintenance of metabolic pathways clearly indicated that myocardial enzymes of old rats did not respond to 2 mg/kg GH treatment. Cardiac muscle utilizes a variety of substrates to produce energy, shifting from one substrate to another depending on food intake and pathophysiological state [20]. The uptake of circulating FFA by myocardium increases as the circulating level rises and the FFA/Albumin ratio rises [43]. Cells of non-adipose tissues have a limited capacity for lipids storage, and when this capacity is exceeded, result in cellular dysfunction [24]. Excess of fatty acids that are not oxidized are sequestered for triacylglycerol synthesis (Table 3). Lipid accumulation within the myocardium is susceptible to oxidative stress resulting cardiac lipotoxicity that is attributable to an imbalance between fatty acid uptake and oxidation [43].

HD ingestion, in H+PL group, leads to an increased myocardial glycolytic pathway (Table 3). Furthermore H+PL rats showed depressed oxygen consumption, which in turn will reduce energy generation for myocardial contractile function [15]. Both, PFK and PiDH are enzymes that control the flux of intermediaries' metabolites of glucose. This enhanced glucose metabolism is a response to the higher sucrose content of HD. Glycolysis preferentially serves energy channeling to sarcolemmal membranes, where glucose transport into cells occurs, by providing this readily available substrate for glycolytic enzymes bound to sarcolemmal molecular complexes [43]. The increased glycolytic pathway relative to aerobic metabolism, as showed by the CS maintenance, generates more ROS and is associated with cellular integrity alteration, resulting in enhanced LH and cardiac lipotoxicity in H+PL rats.

In conclusion, the present study brought new insights on obesity and aging demonstrating for the first time that obesity was reproducible in old rats fed with hypercaloric diet. GH treatment was harmful on calorimetric parameters, lipid profile and oxidative stress in aged and obesity conditions. GH was disadvantageous in old rats having indirect undesirable effects on cardiac energy metabolism.

References

1. Acevedo PL. Envejecimiento poblacional y menopausia en Latinoamerica. In: CAMPOS, OG Menopausia y longevidad: perspectiva clínica y epidemiologica en Latinoamerica. Santiago de Chile: Bywaters, 1998: 49-72.
2. Kireev RA, Tresguerres ACF, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JAF. Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-oxidant functions of the liver in aging male rats. J Pineal Res 2007; 42:64-70.
3. Everitt AV, Cavanagh LM. The ageing process in the hypophysectomized rat. Gerontologia 1965; 11:198-207.
4. Brown-Borg HM. Hormonal regulation of longevity in mammals. Ageing Res Rev 2007; 6:28-45.
5. Copeland KC, Colleti BR, Devlin JT, McAuliffe TL. The relationship between insulin-like growth factor-I, adiposity and aging. Metabolism 1990; 39:584-587.
6. Hajima SV, Van Dam PS, Vries WR, Maitimu-Smeele I, Dieguez C, Casanueva FF, Koppeschaar HP. The GHRH/GHRP-6 test for diagnosis of GH deficiency in elderly or severely obese men. Eur J Endocrinol 2005; 152: 575-580.
7. Shadid S, Jensen MD. Effects of growth hormone administration in human obesity. Obes Res 2003;11: 170-175.
8. Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. Br Med J 2001; 322:716-720.
9. Cuttica CM, Castoldi L, Gorrini GP, Peluffo F, Delitala G, Filippa P, Fanciulli G, Giusti M. Effects of six-month administration of rhGH to healthy elderly subjects. Aging 1997; 9: 193-197.
10. Angelopoulos TJ, Seip RL, Cole TG. Effect of short-term recombinant hGH administration on plasma lipoprotein in elderly adults. Gerontology 1998; 44: 228-231.
11. Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. Endocr Rev 2006; 27 : 750-761.
12. Garcia BM, Múgica DJ. Proteínas transportadoras. Receptores. Acciones biológicas. IGF. In: Tresguerres JAF, Aguilar BLE, Múgica DJ, Moreno EB. Tratado de endocrinología Básica y clínica. Madrid Ed. Síntesis, SA 2000: 379-418.

13. Castillo C, Cruzado M, Ariznavarreta C, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Cachofeiro V, Tresguerres JA. Effect of recombinant human growth hormone on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats. *Biogerontology* 2005; 6: 303-312.
14. Rosén T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990; 336:285-288.
15. Novelli ELB, Souza GA, Ebaid GMX, Rocha KKHR, Seiva FRF, Mani F, Campos KE, Sforcin JM. Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease in rats. *Obesity* 2010; 18:1754-1761.
16. Souza GA , Ebaid GX , Seiva FRF , Rocha KHR , Galhardi CM , Mani F , Novelli ELB. N-acetylcysteine in Allium plant compound improves high sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 11: 1–7.
17. Seiva FRF , Ebaid GMX , Castro AVB , Okoshi K , Nascimento A , Rocha KKH, Padovani CR , Cicogna AC , Novelli ELB. Growth Hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats. *Growth Horm IGF-I Res* 2008; 18:275– 283.
18. Pérez-Romero A , Amores A , Salamé F , Ariznavarreta C , Tresguerres JÁ. Efectos de la administración de rhGH en ratas macho viejas. *Endocrinol Nutr* 1999; 46: 31.
19. Seiva FRF, Berbert CMS, Souza GA, Rocha KKH, Ebaid GMX, Burneiko RCM, Novelli ELB. Energy expenditure, lipid profile, oxidative stress and cardiac energy metabolism after growth hormone treatment in obese young rats. *Horm Metab Res* 2010; 42: 486-501.
20. Novelli ELB, Santos P, Assalin H, Souza G, Rocha K, Ebaid G, Seiva F, Mani F, Fernandes A. N-acetylcysteine in high sucrose induced obesity: energy expenditure, metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res* 2009; 59:74–79.
21. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007; 41: 111–119.
22. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli ELB, Padovani CR, Cicogna AC. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res* 2008; 41:253-259.
23. Labayen I , Forga L , Martinez JA. Nutrient oxidation and metabolic rate as affected by meals containing different proportions of carbohydrate and fat, in healthy young women. *Eur J Nutr* 1999; 38:158–166.

24. Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FRF, Almeida FQA, Galhardi CM, Novelli Filho JLVB, Mani F, Novelli ELB. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol* 2008; 124:92-99.
25. Castelli WP , Abbot RD , Mcnamara PM.. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circ* 1983; 67:730–734.
26. Lowry OH , Rosembrough NL , Farr AL , Randall RJ Protein measurement with the folin-phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193:265–275.
27. Jiang ZY , Woollard A , Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe 3+ in the presence of xylenol orange. *Lipids* 1991; 26:853–856.
28. Bass A , Brdicka PE , Eyer P , Hofer S , Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* 1969; 10:198–206.
29. Iossa S, Lionetti L, Mollica mP, Barletta A, Liverini G. Energy intake and utilization vary during development in rats. *J Nutr* 1999; 129:1593-1596.
30. Micmacher E, Assumpção RP, Redorat RG, Spina LD, Cruz IC, Silva CA, Vaisman M, Conceição FL. Growth hormone secretion in response to glucagon stimulation test in healthy middle-aged men. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009; 53:853-858.
31. Owen CG, Whincup PH, Orfei L, Chou QA, Rudnicka AR, Wathern AK, kaye SJ, Eriksson JG, Osmond C, Cook DG. Is body mass index before middle age related to coronary heart disease risk in later life? Evidence from observational studies. *Int J Obes* 2009;7:1-12.
32. Schmidt W, Poll-Jordan G, Loffler G. Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J Biol Chem* 1990; 265:15489–15495.
33. Chen NX, Hausman GJ, Wright JT. Influence of thyroxine in vivo on preadipocyte development and insulin-like growth factor-I and IGF binding protein secretion in fetal stromalvascular cell cultures. *Obes Res* 1996; 4:357–366.
34. Bieri JG, Stoenband GS, Briggs GM, Phillips RW, Woodand JC, Knpha JJ. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of nutrition Ad Hoc Committee on Standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977; 107:1340–1348.
35. Diniz YS, Santos PP, Assalin HB, Souza GA, Rocha KK, Ebaid GM, Seiva FR, Amauchi JF, Novelli Filho JL, Novelli EL. Conjugated Linoleic acid and cardiac health: oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diets. *Eur J Pharmacol* 2008; 579:318-325.

36. Bramnert M, Segerlantz M, Laurila E, Daugaard JR, Manhem P, Groop L. Growth hormone replacement therapy induces insulin resistance by activating the glucose-fatty acid cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1455-1463
37. Angelin B, Rudling M. Growth hormone and hepatic lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:160-165.
38. Elam MB, Wilcox HG, Solomon SS, Heimberg M. In vivo growth hormone treatment stimulates secretion of very low density lipoprotein by the isolated perfused rat liver. *Endocrinology* 1992;131:2717–2722.
39. Sjöberg A, Oscarsson J, Eden S, Olofsson SO. Continuous but not intermittent administration of growth hormone to hypophysectomized rats increases apolipoprotein-E secretion from cultured hepatocytes. *Endocrinology* 1994; 134:790–798.
40. Rudling M, Olivecrona H, Eggertsen G, Angelin B. Regulation of rat liver low density lipoprotein receptors: in vivo stimulation by growth hormone is not mediated by insulin-like growth factor I. *J Clin Invest* 1996; 97:292–299.
41. Rollo CD, Carlson J, Sawada M. Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radical process. *Can J Zool* 1996; 74:606-620.
42. Bartke A, Brown-Borg H. Life extension in the dwarf mouse. *Curr Top Dev Biol* 2004; 63: 189-225.
43. Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 2007; 101:335-347.

Table 1. General characteristics and nutritional parameters of rats receiving standard chow, water and saline (C+PL); rats receiving standard chow, water and GH (C+GH); rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline (H+PL) and rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH (H+GH).

Parameters	Groups			
	C + PL	C + GH	H + PL	H + GH
Initial body weight [g]	511.1±33.0	543.2±34.5	513.4±61.2	561.7±54.2
Final body weight [g]	497.0 ±35.5	556.2±35.4	584.4±57.3 ^a	605.8±69.6
Abdominal Circumference [cm]	17.00±0.47	20.00±0.38 ^a	20.00±0.79 ^a	20.00±1.80
Body mass index [g/cm ²]	0.64±0.02	0.77±0.06 ^a	0.81±0.08 ^a	0.74±0.08
Lee index [g/cm]	5.87±0.36	6.92±0.43 ^a	7.13±0.86 ^a	6.97±0.87
Food Consumption [g/day]	36.83±2.23	39.00±5.32	14.57±5.62 ^a	13.29±3.55 ^b
Liquid Consumption [mL/day]	46.67±6.83	45.00±15.81	55.71±9.32	52.14±6.99
Energy Intake [Kcal/day]	84±7.35	93.5±11.76	164.75±21.46 ^a	168.06±54.27 ^b
Feed Efficiency [g/Kcal]	5.95±0.60	5.99±0.43	3.61±0.49 ^a	3.84±0.92 ^b
Adiposity [%]	4.14±1.19	5.56±0.52 ^a	7.88±1.03 ^a	7.85±0.59 ^b
IGF-I [ng/ml]	1029.87±143.39	1182.35±161.52 ^a	1268.79±351.07 ^a	1277.59±388,60

Values are expressed as mean ± SD. ^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH.

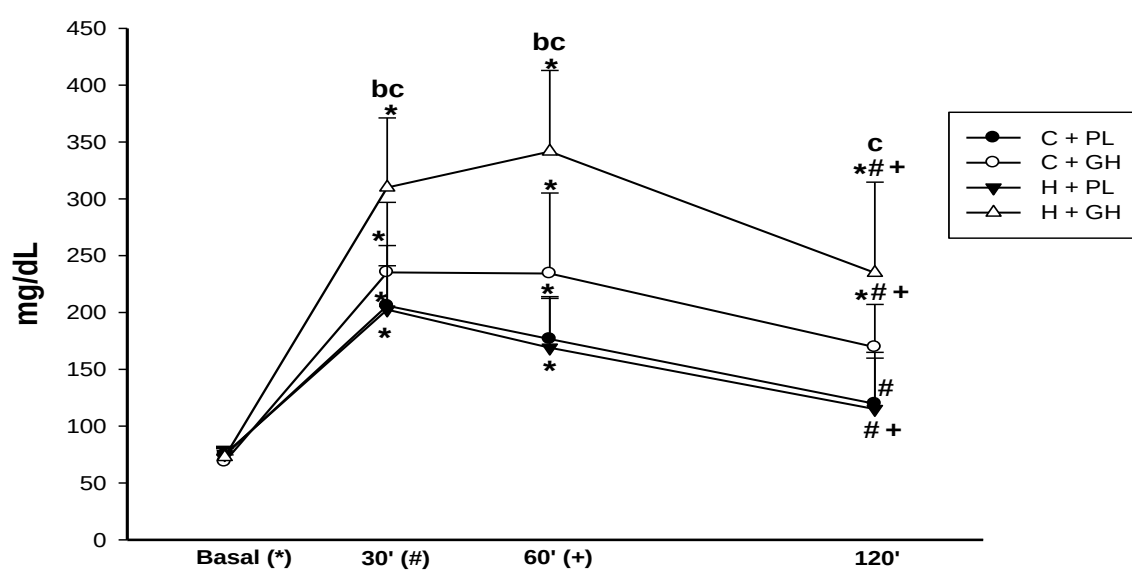


FIG.1 Oral glucose tolerance test of rats receiving standard chow, water and saline (C+PL); rats receiving standard chow, water and GH (C+GH); rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline (H+PL) and rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH (H+GH).

^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH; * $p < 0.05$ vs basal glucose level; # $p < 0.05$ vs 30 min glucose level; + $p < 0.05$ vs 60 min glucose level

TABLE 2. Calorimetric parameters of rats receiving standard chow, water and saline (C+PL); rats receiving standard chow, water and GH (C+GH); rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline (H+PL) and rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH (H+GH).

Calorimetric parameters	Groups			
	C + PL	C + GH	H + PL	H + GH
RQ	0.58 ± 0.15	0.56 ± 0.05	0.57 ± 0.07	0.43 ± 0.04 ^{bc}
RMR/body weight [Kcal/h.Kg]	1.17 ± 0.22	1.18 ± 0.10	1.13 ± 0.13	1.44 ± 0.14 ^{bc}
VO ₂ /body weight [ml/h/g]	0.51 ± 0.12	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.05 ^a	0.54 ± 0.06 ^{bc}
VCO ₂ /body weight [ml/h/g]	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.00 ^{bc}
VO ₂ /surface area [ml/h/g ^{0.7}]	3.33 ± 0.78	3.11 ± 0.32	2.90 ± 0.39 ^a	3.72 ± 0.43 ^{bc}
Carbohydrate oxidation [mg/min]	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Fat oxidation [mg/min]	5.05 ± 2.69	4.89 ± 1.15	4.56 ± 1.40	7.95 ± 1.64 ^{bc}

RQ, respiratory quotient; RMR, resting metabolic rate; VO₂, oxygen consumption; VCO₂, carbon dioxide production.

Values are expressed as mean ± SD. ^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH; ^c $p < 0.05$ vs H+PL.

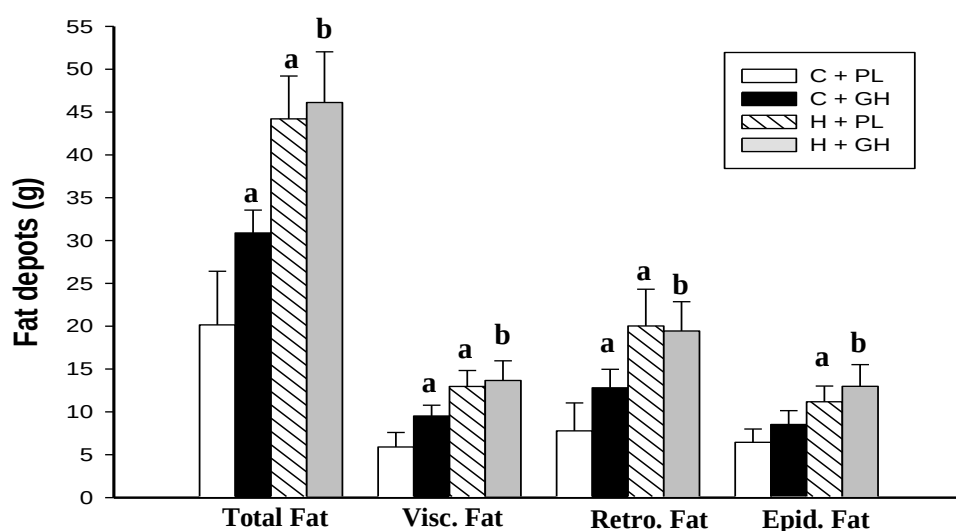


FIG. 2. Fat contents. Visceral fat (Visc. Fat), retroperitoneal fat (Retro. Fat) and epididymal fat (Epid. Fat) in rats receiving standard chow, water and saline (C+GH); standard chow, water and GH (C+GH); hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline (H+PL), hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH (H+GH).

Values are expressed as mean $\pm$ SD. ^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH.

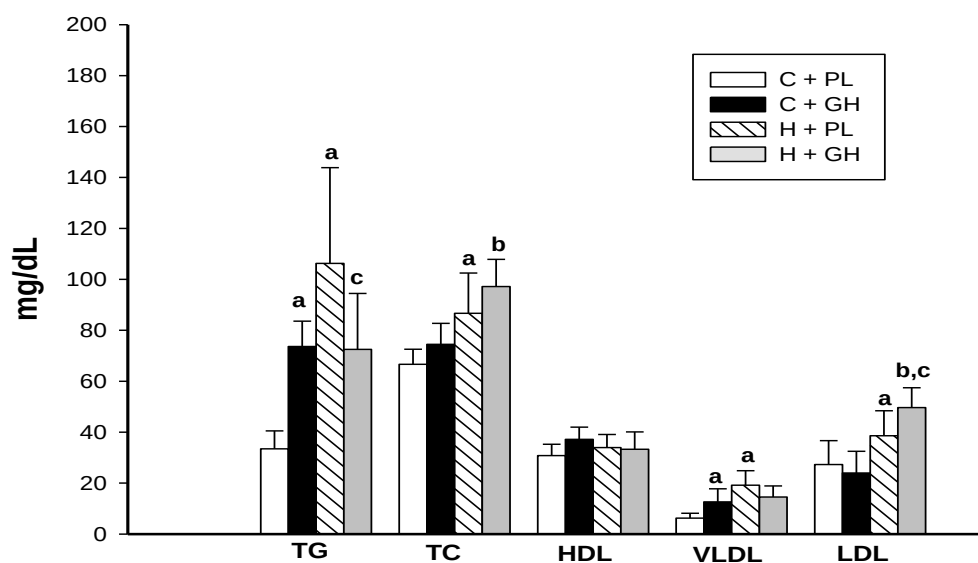


FIG. 3. Serum lipidic profile. Triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), very-low density lipoprotein (VLDL) and low density lipoprotein (LDL) in rats receiving standard chow, water and saline (C+GH); standard chow, water and GH (C+GH); hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline (H+PL), hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH (H+GH).

Values are expressed as mean $\pm$ SD. ^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH; ^c $p < 0.05$ vs H+PL.

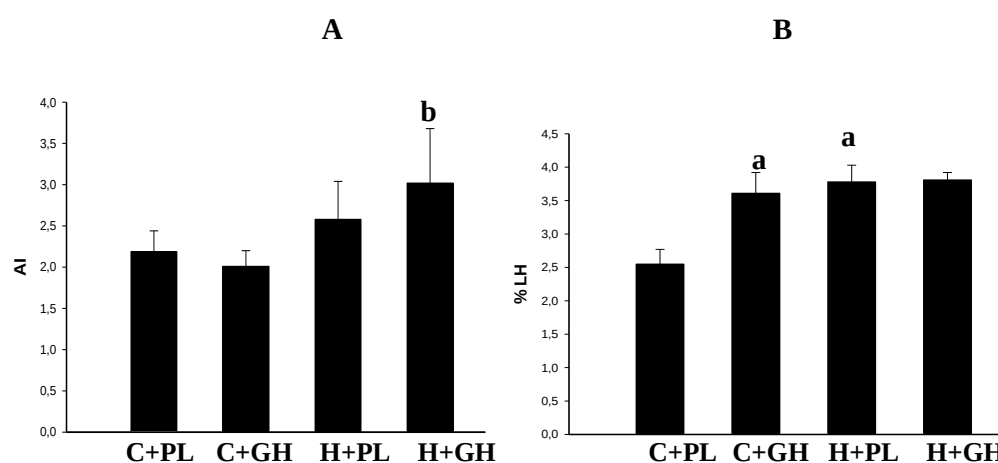


FIG. 4. A – Atherogenic index (AI) and B - Cardiac lipid hydroperoxide (LH) in rats receiving standard chow, water and saline (C+GH); standard chow, water and GH (C+GH); hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline (H+PL), hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH (H+GH).

Values are expressed as mean $\pm$ SD. ^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH.

TABLE 3. Enzyme activities in cardiac tissue of rats receiving standard chow, water and saline; C+GH, rats receiving standard chow, water and GH; H+PL, rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and saline; (H+GH), rats receiving hypercaloric chow, 30% sucrose in its drinking water and GH.

Cardiac Parameters	Groups			
	C + PL	C + GH	H + PL	H + GH
Protein [%]	16.95 ± 2.8	17.12 ± 2.1	15.50 ± 1.01	16.77 ± 2.8
Triacylglycerol [mg/g tissue]	3.99 ± 0.3	4.61 ± 0.4 ^a	4.45 ± 0.3	5.03 ± 0.4 ^c
CS [nmol/mg protein]	408.1 ± 48.2	430.8 ± 47.2	446.11 ± 57.05	466.97 ± 37.2
LDH [μmol/mg protein]	1.41±0.18	1.55±0.27	1.44±0.34	1.46±0.15
PFK [nmol/mg protein]	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.02
PiDH [nmol/mg protein]	0.38 ± 0.1	0.59 ± 0.2	0.99 ± 0.3 ^a	0.76 ± 0.08

CS, citrate synthase; LDH, lactate dehydrogenase; PFK, phosphofructokinase; PiDH, pyruvate dehydrogenase. Values are expressed as mean ± SD. ^a $p < 0.05$ vs C+PL; ^b $p < 0.05$ vs C+GH; ^c $p < 0.05$ vs H+PL.