

Vanessa de Oliveira Moreira

**A administração de GH atenua o desenvolvimento de
fibrose miocárdica em ratos com insuficiência cardíaca
secundária à estenose aórtica.**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiopatologia em
Clínica Médica, da Faculdade de Medicina
de Botucatu, UNESP para obtenção do
título de Mestre. Área de: Metabolismo.**

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Valéria Barros de Castro
Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna**

Botucatu-SP

2006

Estudo realizado no Laboratório Experimental de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Moreira, Vanessa de Oliveira.

A administração de GH atenua o desenvolvimento de fibrose miocárdica em ratos com insuficiência cardíaca secundária a estenose aórtica / Vanessa de Oliveira Moreira. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2006.

Orientador: Ana Valéria Barros de Castro

Co-orientador: Antonio Carlos Cicogna

Assunto CAPES: 40101100

1. Insuficiência cardíaca - Fisiopatologia 2. Doenças cardíacas - Efeito das Drogas - Estudos Experimentais 3. Hormônio de crescimento - Efeitos fisiológicos

CDD 612.17

Palavras-chave: Ecocardiograma; Fibrose; Hormônio de crescimento(GH); Insuficiência cardíaca; Ratos

Pegadas na Areia

“Uma noite eu tive um sonho... Sonhei que estava andando na praia com o Senhor, e através do céu, passavam cenas da minha vida. Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia, um era meu e outro era do Senhor. Quando a ultima cena da minha vida passou diante de nós, olhei para traz, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes no caminho da vida havia apenas um par de pegadas na areia. Notei também que isto aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso aborreceu-me, então perguntei ao Senhor:

-Senhor, Tu me disseste que uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o meu caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que necessitava de Ti, tu me deixastes...

O Senhor respondeu:

-Meu precioso filho, Eu Te Amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e de teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí, que Eu te carreguei nos braços.”

Autor desconhecido

**Aos meus pais HAYDÉE e RUBENS, e meu
irmão RUBINHO,
“Vocês são a minha razão de viver,
amo muito vocês”**

Agradecimentos especiais

A Profa Dra. *Ana Valéria Barros de Castro*, minha orientadora, pela amizade, pela pessoa maravilhosa que é e por tudo o que me ensinou;

Ao Prof Dr. *Antonio Carlos Cicogna*, meu co-orientador, por ter me incluído em seu seletto grupo de pesquisa, pela amizade e incentivo;

A Prof^a. Dra. *Haydée Maria Moreira*, grande pesquisadora, mulher, amiga e MÃE, por todo o incentivo, amor e carinho que me proporcionou sempre. Amo você.

MUITO OBRIGADA!

A Deus, pois sem ele eu não estaria aqui.

A **todas as pessoas** que de alguma forma colaboraram pela realização deste trabalho.

A **todos os meus familiares** pelo apoio e carinho.

Ao meu padrinho **Mário Luís**, pela amizade, carinho e por ter me ajudado a chegar até aqui.

A minha super prima **Vivi**, pela ajuda com o mundo da informática.

A minha cunhada e amiga **Isabella**, pela amizade, apoio e pelo carinho com que cuida do meu irmão.

A **todos os meus amigos**, pelo carinho, sinceridade, incentivo e amizade.

As grandes amigas **Vera Lúcia e Ana Raquel**, por tudo...

A amiga **Cristiane Guarido**, por ter compartilhado minhas alegrias, angústias e realizações.

Ao amigo **Cristiano Galhardi**, por toda ajuda que me deu quando cheguei em Botucatu.

Aos amigos do **Fazzio** e da **Personal Méd** pelo incentivo e amizade.

A minha amiga **Paula Ângelo**, da Pubtec pela ajuda na formatação da dissertação.

Ao querido **Augusto** pelos conselhos

Ao Mestre **Houtan Noushmehr**, pelos ensinamentos de Biologia Molecular.

Ao **Prof. Dr. Katashi Okoshi**, pela realização do ecocardiograma nos animais deste estudo, e pelo apoio.

Aos **Prof. Dr. Carlos Padovani** e **Prof. Dr. Flávio Aragon**, pela elaboração das análises estatísticas e pela amizade.

A **Prof. Dra. Ethel Novelli**, por ter acreditado no meu potencial quando cheguei em Botucatu e pelo incentivo.

Ao **Prof. Dr. Sérgio**, do departamento de morfologia, pela ajuda prestada com a leitura das lâminas.

Ao pessoal do "Labcic", **Alessandro Bruno**, **Ana Paula**, **André Leopoldo**, **André Nascimento**, **Dijion**, **Paula**, **Robson** e **Sílvio**, pela ajuda, apoio, e por serem meus amigos.

Aos amigos do grupo de pesquisa, **Fábio**, **Dênis**, **Marcelle**, **Mirela** e **Camila**, muito obrigada, em especial ao **Fábio** pela amizade de todas as horas, pelo filme Little Chicken e pelo macarrão com brócolis.

A todos os **funcionários** e **amigos** do laboratório experimental, muito obrigada por tudo.

Aos funcionários do laboratório experimental **José Carlos Georgete**, **Mário Bruno** e **Vítor** pela ajuda na execução deste trabalho, apoio e amizade.

Aos **funcionários** do departamento de Clínica Médica, e da pós-graduação, muito obrigada pela atenção e ajuda.

Histórico 1	01
CAPÍTULO 1	
Resumo	02
Abstract	03
1-Introdução	04
2-Métodos	05
2.1-Estudo <i>in vivo</i>	05
2.2-Animais e protocolo experimental.....	06
2.3-Indução de cardiomiopatia hipertrófica por EAo	06
2.4-Avaliação ecocardiográfica.....	06
2.5-Análise de agrupamento em estágios de insuficiência cardíaca.....	08
2.6-Técnica de discriminação gráfica de Fisher.....	08
3-Resultados	09
4-Discussão.....	12
5-Referências	16
CAPÍTULO 2	
Resumo	19
Abstract1	20
Introdução	21
2-Objetivo.....	23
3-Métodos	23
3.1-Estudo	24
3.2-Animais e protocolo experimental.....	24
3.3-Indução da cardiomiopatia hipertrófica por Eao.....	24
3.4-Critério para seleção dos animais.....	24
3.5-Avaliação ecocardiográfica.....	25
3.6-Grupos experimentais	26
3.7-Eutanásia	27
3.8-Avaliação hormonal	27
3.9-Avaliação da fibrose	27
3.10-Análise estatística.....	28
4-Resultados	28
5-Discussão.....	30
6-Conclusão	34
7-Referências	35

AE – Átrio esquerdo

AO – Raiz da aorta

C - Controle

E/A – Relação da onda E pela onda A do fluxo transmitral

EAO – Estenose aórtica

DDVE – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE – Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

EDPP – Espessura diastólica da parede posterior

ESPP – Espessura sistólica da parede posterior

EDSIV – Espessura diastólica do septo interventricular

ESSIV – Espessura sistólica do septo interventricular

GH – Hormônio de crescimento

IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile, tipo 1

IMVE – Índice de massa de ventrículo esquerdo

PC – Peso corporal

PI – Placebo

% Enc. Endo – Porcentagem de encurtamento endocárdico

% Enc. Mio – Porcentagem de encurtamento miocárdico

VE – Ventrículo esquerdo

VEPP – Velocidade de encurtamento da parede posterior

HISTÓRICO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com hormônio de crescimento sobre aspectos morfofuncionais cardíacos de ratos portadores de estenose aórtica.

Inicialmente, após a detecção de taquipnéia, os ratos com estenose aórtica, eram submetidos à primeira avaliação funcional, realizada pelo ecocardiograma e, alocados, aleatoriamente, para o tratamento hormonal ou placebo, após o qual a segunda avaliação funcional era realizada.

No entanto, ao analisarmos, preliminarmente, os dados funcionais, percebemos que os animais apresentaram-se muito heterogêneos, o que dificultaria a avaliação do efeito do tratamento. Em parte, isto decorreu da dificuldade em se visualizar e quantificar a taquipnéia nestes animais e da subjetividade do critério adotado.

Por outro lado, não havíamos encontrado na literatura, critérios objetivos *in vivo* que fosse empregado no modelo em estudo.

Deste modo, com o objetivo de homogeneizar os animais portadores de estenose aórtica, quanto ao grau de comprometimento cardíaco, o estudo mostrado no capítulo 1 foi realizado. Os resultados obtidos auxiliaram na realização do estudo proposto, inicialmente, e descrito no capítulo 2.

CAPÍTULO 1

RESUMO

Em modelos experimentais de agressão cardíaca, a dificuldade de se estabelecer uma classificação *in vivo* do grau de disfunção ventricular tem restringido a realização de estudos longitudinais. O objetivo deste estudo foi identificar variáveis ecocardiográficas que definam graus de insuficiência cardíaca em ratos com estenose aórtica (EAo).

Foram usados ratos Wistar (n=23), machos (90-100 g) submetidos à cirurgia para indução de EAo. O grupo controle consistiu de 12 animais. Após a constatação de taquipnéia, foi realizado o exame ecocardiográfico. As variáveis analisadas foram: diâmetros diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e sistólico do átrio esquerdo em valores absolutos e normalizados para o peso corporal; diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE); três índices de encurtamento do VE (%Enc.Endo, %Enc.Mio e velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP)); índice de massa do VE (IMVE); e relação E/A do fluxo transmitral. Essas variáveis foram utilizadas para a análise de agrupamento ("cluster analysis"). Para a elaboração de critério de alocação de novos animais em diferentes grupo, pela técnica discriminatória gráfica de Fisher, utilizamos apenas as cinco variáveis que melhor discriminaram os grupos, são elas: DDVE corrigido pelo peso corporal, AE/PC (átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal), IMVE, %Enc Endocárdico e Miocárdico.

A análise de agrupamento possibilitou separar os ratos com EAo em dois grupos distintos quanto à gravidade do acometimento cardíaco, que foram denominados de disfunção leve (n=13) e disfunção grave (n=9). Um animal não se agrupou em nenhum das classificações. Como resultado da função discriminante de Fisher, foi encontrado três grupos distintos quanto a função cardíaca: normal, leve e grave.

Concluimos que a análise de agrupamento e a função discriminante de Fisher, desenvolvidas a partir de variáveis ecocardiográficas são úteis na classificação funcional de ratos portadores de estenose aórtica.

ABSTRACT

The difficulty to detect different degrees of heart dysfunction in laboratory animals, *in vivo*, has restricted longitudinal studies. The purpose of this study was to identify echocardiographic parameters that allow distinguishing different degrees of cardiac dysfunction in aortic banded rats. Wistar male rats (90-100 g) were subjected to aortic banding (n=23) or a sham operation (n=12). Echocardiogram was performed after animals presented tachypnea. The following echocardiographic parameters were evaluated to cluster rats into groups with similar characteristics using cluster analysis: absolute or relative to body weight values of left ventricular end-diastolic diameter (LVDD) and left atrial systolic diameter; left ventricular end-systolic diameter (LVSD); LV weight to body weight ratio (LVW/BW); three indexes of left ventricular shortening (endocardial fractional shortening, EFS; midwall FS, MFS; and posterior wall shortening velocity, PWSV); and ratio of early to late diastolic mitral inflow velocities (E/A). Fisher's discriminatory graphic technique was used to elaborate the criteria to classify new animals into different degrees of cardiac function. Cluster analysis allowed the clustering of aortic banded rats into two groups according to the degree of heart failure severity which were named as mild (n=13) and severe (n=9) stage of heart failure. One animal did not group in any of the two groups. There was no overlapping among the values of the 95% confidence interval of the following parameters between the two groups: LVDD, LVSD, EFS, MFS, LVW/BW, and PWSV. The most discriminatory echocardiographic data were used to elaborate Fisher's equations and allowed to classify new animals into three groups according to cardiac function: normal, mild and severe, with a 99% of precision. In conclusion, cluster analysis and Fisher's technique using echocardiographic data allowed the classification of degrees of heart function in aortic banded rats, *in vivo*.

1- INTRODUÇÃO

Em modelos experimentais de agressão cardíaca, a dificuldade em se estabelecer uma classificação *in vivo* do grau de disfunção ventricular tem restringido a realização de estudos longitudinais, com o intuito de verificar o efeito de intervenções terapêuticas. A obtenção de grupos homogêneos de animais quanto ao grau de disfunção do coração é de fundamental importância, uma vez que efeitos benéficos ou maléficos de um tratamento podem ser observados de acordo com o comprometimento prévio da função ventricular.

Tradicionalmente, o diagnóstico de insuficiência cardíaca em animais é baseado na medida da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (VE), que requer a cateterização ventricular, incorrendo em risco de lesões de valvas cardíacas e, em consequente alteração da performance do coração¹. Outros critérios para o diagnóstico de insuficiência cardíaca baseiam-se na presença de alterações clínicas e anatômicas, tais como taquiplnéia, derrame pleural, ascite, trombo no átrio esquerdo e hipertrofia ventricular direita, sendo a maioria delas identificadas após o sacrifício do animal^{2,3,4,5}.

O ecocardiograma é um importante exame auxiliar no diagnóstico clínico de insuficiência cardíaca, que permite avaliar: 1) morfologia e função do coração; 2) evolução da insuficiência cardíaca causada por diferentes tipos de agressão^{6,7,8}; 3) efeitos cardíacos de intervenções farmacológicas⁴.

Em pequenos animais, o ecocardiograma transtorácico é um dos métodos mais frequentemente utilizados para avaliar a dimensão das estruturas cardíacas e o desempenho contrátil do VE^{4,5,6,7,8,9,10}. Habitualmente, a identificação de disfunção ventricular é realizada comparando-se os índices de encurtamento muscular com aqueles obtidos no grupo controle.

Recentemente, Sjaastad et al.¹ identificaram as variáveis mais importantes para o diagnóstico ecocardiográfico de insuficiência cardíaca em ratos infartados utilizando o método estatístico de análise de agrupamento. Esse método foi utilizado também para determinar a evolução funcional cardíaca durante a remodelação induzida pela ligadura da artéria coronária². Entretanto, não há relatos na literatura de estudos ecocardiográficos em modelos experimentais de estenose aórtica que tenham focado os graus de disfunção ventricular. O modelo de estenose aórtica em ratos é largamente utilizado por induzir hipertrofia ventricular gradual evoluindo

para disfunção ventricular. Nesse modelo, um clipe é colocado na aorta ascendente e a estenose se desenvolve de maneira proporcional ao crescimento corporal do animal.

Postulamos a hipótese de que a elaboração de uma função discriminante, obtida a partir de variáveis ecocardiográficas, permitirá identificar diferentes graus de insuficiência cardíaca a partir do momento de aparecimento de taquipnéia, em um modelo de sobrecarga pressórica induzida por clampeamento da raiz da aorta que, habitualmente, evolui com hipertrofia do VE e insuficiência cardíaca progressiva ^{11,12}.

O objetivo desse estudo foi, portanto, identificar as variáveis ecocardiográficas que definam os graus de disfunção ventricular na fase de hipertrofia compensada à descompensação (taquipnéia), em ratos portadores de estenose aórtica. A identificação dessas variáveis permitirá estabelecer os estágios da remodelação cardíaca induzida pela sobrecarga pressórica e avaliar os efeitos cardíacos de intervenções farmacológicas em diferentes momentos do processo progressivo da insuficiência cardíaca.

2- MÉTODOS

O protocolo experimental desse estudo foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ¹³.

2.1. ESTUDO *in vivo*

Realizou-se estudo controlado, randômico, sem conhecimento quanto à gravidade da cardiopatia.

Foi utilizado um modelo animal de cardiopatia hipertrófica, secundária à sobrecarga ventricular esquerda, induzida pela estenose aórtica.

2.2. ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal inicial de 70 a 80 g, provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas, 1 rato/caixa (após a detecção de taquipnéia), à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de 12h. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com ração Labina e água *ad libitum*.

2.3. INDUÇÃO DA CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA POR EAo CIRURGIA

Para a indução da estenose aórtica, os animais foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a, aproximadamente, 3 mm de sua raiz. Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual à pressão positiva.^{5,14,15}

2.4. AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Essa avaliação foi feita pelo mesmo observador, que desconhecia qual animal era controle ou portador de EAo.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o exame foi realizado com o equipamento modelo Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co., equipado com transdutor eletrônico de 7,5 MHz. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando-se o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (16-18). As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas em modo-M foram registradas em impressora modelo UP-890 da Sony Co.

Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro de precisão. Os valores das medidas das estruturas cardíacas representam a média aritmética de, pelo menos, 5 ciclos cardíacos consecutivos. Os diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE foram medidos no momento do ciclo cardíaco em que seus valores eram máximo e mínimo, respectivamente. As espessuras diastólicas e sistólicas da parede posterior (EDPP e ESPP) e do septo interventricular (EDSIV e ESSIV) foram medidas no momento em que a cavidade ventricular esquerda apresentava diâmetro máximo e mínimo, respectivamente. A medida da raiz da aorta (AO) foi realizada no instante imediatamente anterior à abertura da valva aórtica. O átrio esquerdo (AE) foi medido no momento em que seu diâmetro era máximo. A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada pela porcentagem de encurtamento sistólico (diâmetro diastólico – diâmetro sistólico) / (diâmetro diastólico) e pela velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo. A função diastólica do VE foi avaliada pela razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral. A avaliação da disfunção diastólica e sistólica também foi baseada na relação do diâmetro do átrio esquerdo relativamente ao peso corporal (PC). A hipertrofia ventricular esquerda foi avaliada pelo índice de massa ventricular esquerda e pela relação do diâmetro diastólico do VE relativamente ao PC.

As variáveis derivadas das dimensões acima descritas foram:

- espessura relativa do VE= $EDPP/DDVE$
- massa do VE (MVE, g)= $1,04 \times [(EDPP+EDSIV+DDVE)^3 - DDVE^3]$, onde 1,04 é a densidade específica do miocárdio.
- índice de MVE (IMVE, g/kg)= $MVE/\text{peso corporal}$
- porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. Endo.)= $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$
- porcentagem de encurtamento miocárdico (% enc. Mio.)= $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDSIV + \frac{1}{2} EDPP) - (DSVE + \frac{1}{2} ESSIV + \frac{1}{2} ESPP)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDSIV + \frac{1}{2} EDPP)\} \times 100$.
- velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP, mm/s): calculada a partir da tangente máxima do movimento sistólico do endocárdio da parede posterior do VE.

2.5 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO EM ESTÁGIOS DE DISFUNÇÃO CARDÍACA

Foram utilizadas 10 variáveis ecocardiográficas, sendo elas: diâmetros diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e sistólico do átrio esquerdo em valores absolutos e normalizados para o peso corporal; diâmetro sistólico do VE (DSVE); três índices de encurtamento do VE (%Enc.Endo, %Enc.Mio e velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP)); índice de massa do VE (IMVE); e relação E/A do fluxo transmitral. E foram estabelecidos os limites de confiança, de 95%, que permitiu selecionar os ratos de acordo com a função cardíaca desejada.

Considerando, isoladamente, as variáveis ecocardiográficas de 23 animais portadores de EAo, utilizou-se a técnica de análise de agrupamento (“cluster analysis”) para se estabelecer grupos de similaridade quanto à gravidade da doença.

O procedimento empregado na análise dos conglomerados considerou, para a formação dos grupos, a estratégia **SAHN**, que envolve agrupamentos **seqüenciais**, **aglomerativos**, **hierárquicos** e **não-superpostos**, tendo como método de agrupamento a técnica do vizinho mais próximo (SLM: “single linkage method”) e como coeficiente de similaridade a distância euclideana média ¹⁹.

2.6- TÉCNICA DE DISCRIMINAÇÃO GRÁFICA DE FISHER

A partir da caracterização dos grupos de estudos, por meio da Análise de Agrupamento, utilizou-se a técnica da discriminação gráfica de Fisher, pela construção das regras de classificação de novos animais nos grupos de estudo. Esta técnica constituiu em definir funções lineares das variáveis ecocardiográficas, que em número de duas representaram os eixos discriminantes para os grupos. O primeiro eixo (horizontal) do plano cartesiano refere-se ao detentor da maior quantidade de informação biológica para a discriminação, enquanto o segundo (vertical), a segunda maior quantidade. A soma das duas quantidades indica total de informação biológica contida no processo gráfico de discriminação.

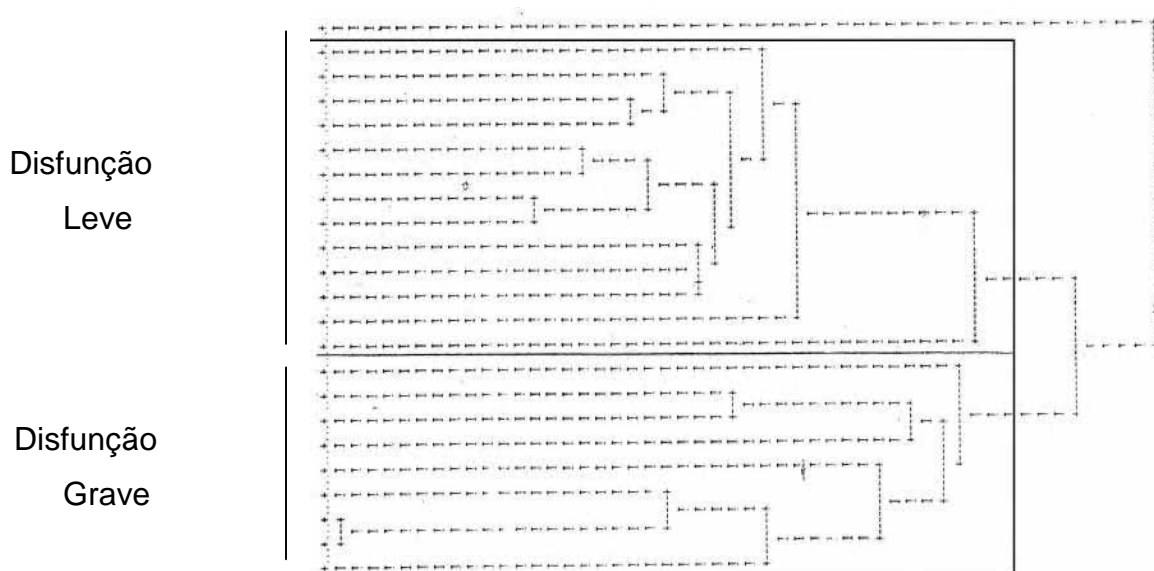
A alocação de um novo animal é executada pelos valores numéricos obtidos nas duas funções representadas no plano cartesiano dos eixos discriminadores, cujo indicativo do mais provável, corresponderá à região de pertinência do valor ²⁰.

Todas as considerações estatísticas foram realizadas no nível de 5% de significância.

3-RESULTADOS

A análise de agrupamento permitiu separar os ratos com estenose aórtica em grupos similares de acordo com a gravidade da disfunção ventricular, aos quais denominamos de disfunção leve (n=13) e disfunção grave (n=9), representados no dendograma da **Fig. 1**. Apenas um animal com estenose aórtica não se encaixou nos grupos já mencionados. Esse animal apresentou os menores valores dos índices de função sistólica do VE e os maiores valores dos diâmetros do VE e átrio esquerdo dos animais com estenose aórtica. Esses valores se posicionaram fora dos limites de intervalos de confiança do grupo de disfunção grave. Portanto, no nosso grupo de ratos com estenose aórtica, um animal apresentou disfunção ventricular mais grave que o grupo denominado disfunção grave.

Fig. 1- Dendograma da Análise de Agrupamento de acordo com variáveis ecocardiográficas de ratos portadores de estenose aórtica, mostrando a seleção exploratória dos grupos.



A **Tab. 1** mostra os valores médios \pm desvio padrão e os respectivos limites dos intervalos de 95% de confiança para as variáveis ecocardiográficas analisadas considerando os grupos controle e estenose aórtica. Os limites dos intervalos de 95% de confiança estão ilustrados nas **Fig. 2 e 3**.

As variáveis ecocardiográficas que indicam as dimensões do VE e átrio esquerdo e massa do VE, normalizados para o peso corporal, apresentaram valores mais elevados no grupo EAO-grave em comparação ao grupo EAO-leve.

As variáveis indicativas de encurtamento ventricular esquerdo (%Enc.Endo e %Enc.Mio) apresentaram valores menores no grupo EAo-grave em relação ao grupo EAo-leve. A relação E/A do VE, que avalia a função diastólica, foi acentuadamente maior no grupo EAo-grave, sendo compatível com o padrão de enchimento ventricular do tipo restritivo.

As variáveis DDVE, DSVE, %Enc.Endo, %Enc.Mio, IMVE e VEPP não apresentaram superposição dos seus valores de intervalos de confiança entre os dois grupos.

As seguintes variáveis obtidas de ratos sem estenose aórtica (controle) mostraram superposição com o grupo EAo-leve: DDVE, DDVE/PC, E/A e VEPP. Houve superposição entre os grupos controle e EAo-grave nas variáveis DSVE, %Enc.Endo e %Enc.Mio.

O grupo controle não apresentou superposição dos intervalos de confiança com outros grupos no diâmetro normalizado do átrio esquerdo e no índice de massa do VE.

Tabela 1 – Intervalos de confiança (95%) das variáveis ecocardiográficas mais discriminantes dos grupos obtidos a partir da análise de agrupamento.

Variável	Grupo					
	Controle (n=12)		Disfunção leve (n=13)		Disfunção grave (n=9)	
	Média±DP	Limite de confiança	Média±DP	Limite de confiança	Média±DP	Limite de confiança
DDVE	8,22±0,56	7,86-8,57	8,38±0,41	8,07-8,70	9,17±0,68	8,76-9,58
DSVE	3,96±0,57	3,60-4,32	2,60±0,67	2,08-3,11	4,56±0,76	4,09-5,02
AE	5,95±0,71	5,50-6,40	7,63±0,98	6,88-8,38	8,81±1,13	8,12-9,49
DDVE/PC	14,90±0,85	14,37-15,44	16,17±1,97	14,65-17,69	18,80±1,98	17,60-20,00
AE/PC	10,82±1,51	9,86-11,78	14,80±3,02	12,49-17,13	18,07±2,66	16,46-19,68
%Enc.Endo	51,97±4,48	49,12-54,82	69,24±6,70	64,09-74,39	50,54±5,40	47,28-53,81
%Enc.Mio	30,98±2,88	29,15-32,81	39,70±3,49	36,99-42,35	27,65±3,20	25,71-29,60
Índice MVE	1,89±0,28	1,71-2,07	2,77±0,54	2,35-3,18	3,69±0,74	3,25-4,14
E/A	1,43±0,26	1,26-1,59	2,64±2,99	0,35-4,94	6,68±2,97	4,89-8,48
VEPP	45,63±6,67	41,36-49,86	45,26±4,42	41,86-48,65	32,85±4,11	30,37-35,34

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo em mm; DSVE: diâmetro sistólico do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo em mm; PC: peso corporal em kg; %Enc.Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; %Enc.Mio: porcentagem de encurtamento da região central das paredes do VE; índice MVE: massa do VE/PC (g/kg); E/A: razão entre as ondas E e A do fluxo transmitral; VEPP: velocidade de encurtamento da parede pôster

Entretanto, esse método de seleção de novos animais de acordo com os intervalos de confiança mostrou-se um modo fragmentado de avaliação funcional

dos animais, pois houve dificuldade de inserí-los em um mesmo grupo de disfunção, analisando-se as variáveis ecocardiográficas, isoladamente. Em parte, devido à superposição de algumas delas entre os diferentes grupos funcionais.

Para solucionar esse problema, foi desenvolvida uma função discriminante pela técnica de Fisher, utilizando as cinco variáveis, simultaneamente, que mais discriminaram os grupos na Análise de Agrupamento ($p < 0,001$): AE/PC, IMVE, VEPP, % Enc endocárdico e miocárdico.

A função discriminante possibilitou diferenciar três grupos funcionais, com precisão de 99,9%: controle, EAo leve e EAo grave.

A fórmula utilizada para a função para a definição dos valores dos eixos foi:

Eixo horizontal

$$X1 = 0,188437 * AE/PC - 0,216861 * \%enc.endo - 0,656054 * \%enc.médio - 1,486010 * IMVE - 0,326327 * VEPP$$

Eixo Vertical

$$X2 = 0,469914 * AE/PC + 1,106150 * \%enc.endo - 0,687396 * \%enc.médio + 11,099200 * IMVE - 0,498903 * VEPP$$

Figura 2- Variáveis ecocardiográficas selecionadas para realização da função:

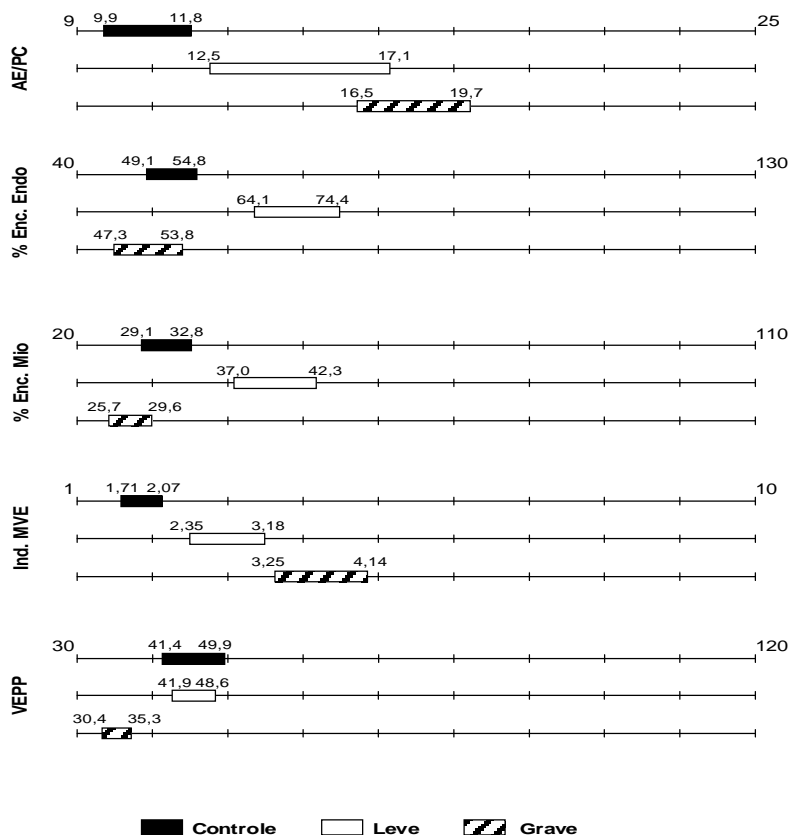
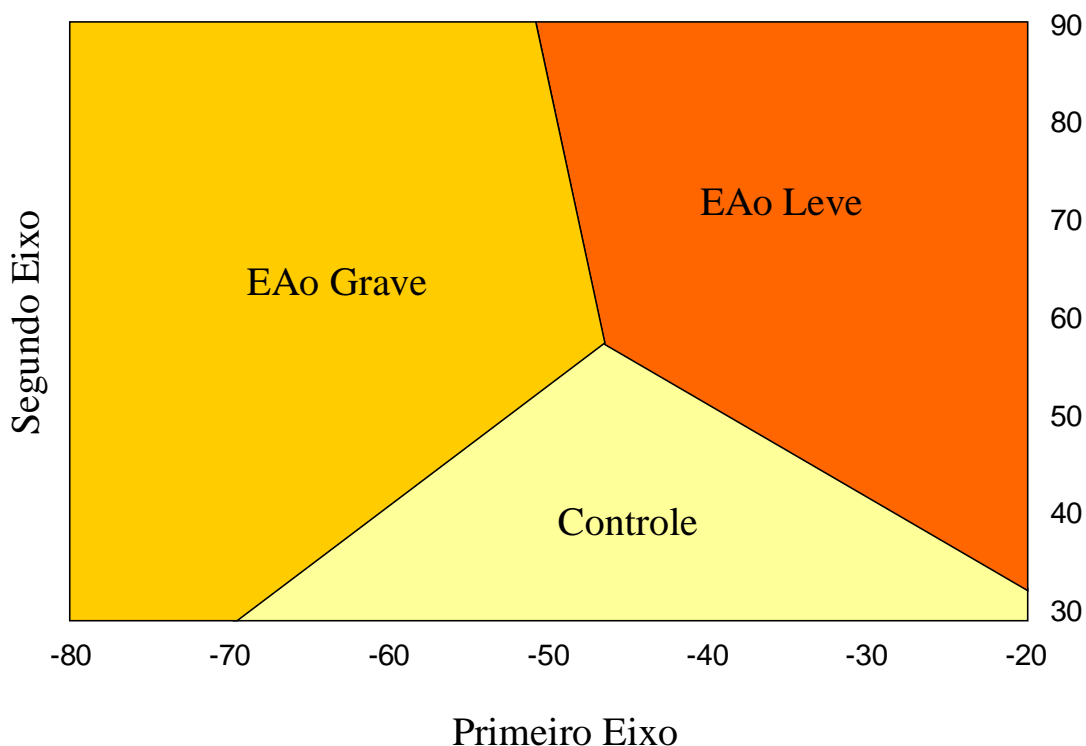


Figura 3 - Regiões Gráfica de Fisher para a discriminação da função cardíaca



4-Discussão

O surgimento e o desenvolvimento do ecocardiograma representou um grande avanço na avaliação *in vivo* do coração. Em pequenos animais utilizados em laboratórios experimentais, esse método tornou possível o acompanhamento do efeito de agressões e/ou tratamentos sobre o coração, de maneira ilimitada quanto ao número de repetições do exame. Em ratos com estenose aórtica, os sinais clínicos para identificar a gravidade da insuficiência cardíaca *in vivo* são limitados. Além disso, o tempo de surgimento dos primeiros sinais de insuficiência cardíaca é variável; em nosso laboratório é habitualmente observado intervalo de 24 a 40 semanas entre a indução de estenose aórtica e o aparecimento de taquipnéia. No presente estudo, o ecocardiograma mostrou que os ratos estavam em diferentes graus de comprometimento cardíaco no momento em que foi identificada a taquipnéia.

Tradicionalmente, nos estudos experimentais, os fármacos são introduzidos em momento pré-determinado após a indução de estenose aórtica ^{11,21}. Portanto, é possível que os animais não apresentassem uniformidade quanto ao

comprometimento do coração no momento da introdução do tratamento. Esta heterogeneidade é um fator importante que pode levar à obtenção de resultados discrepantes. Frente a esta consideração, é de fundamental importância a procura de critérios ecocardiográficos para classificar os animais quanto à gravidade da disfunção ventricular permitindo, dessa forma, a utilização de animais que apresentem comprometimento estrutural e funcional do coração o mais homogêneo possível.

A análise de agrupamento é uma técnica freqüentemente utilizada para agrupar o objeto do estudo, de acordo com a semelhança de suas características^{1,22,23}. Sjaastad et al.¹ estabeleceram critérios ecocardiográficos para a detecção de insuficiência cardíaca em ratos, após infarto do miocárdio, utilizando essa análise. Em nosso estudo, com o auxílio desse método estatístico, procuramos classificar o comprometimento cardíaco dos animais com estenose aórtica e que apresentavam taquipnéia. Para isso, selecionamos variáveis ecocardiográficas cujos valores aumentam progressivamente com o avançar da doença (diâmetros diastólico e sistólico do VE, diâmetro do AE e massa do VE), além de parâmetros indicativos de funções sistólica (%Enc.Endo, %Enc.Mio e velocidade de encurtamento da parede posterior) e diastólica do VE (relação E/A do fluxo transmitral).

A análise de agrupamento permitiu separar os ratos com estenose aórtica em dois grupos, que compartilharam características ecocardiográficas semelhantes (EAo-leve e EAo-grave).

As variáveis DDVE, DSVE, % Enc.Endo, % Enc.Mio, IMVE e VEPP, não apresentaram superposição dos valores dos intervalos de confiança entre os dois grupos. As variáveis DDVE/PC, AE, AE/PC e E/A apresentaram superposição entre os grupos EAo-leve e EAo-grave. Como os diâmetros do VE e AE sofrem influência da variação do peso corporal (PC), torna-se necessária a normalização de seus valores para o PC. Entretanto, esse procedimento também pode causar erros na interpretação dos resultados porque os diâmetros do VE e AE não são exatamente proporcionais ao PC. A superposição das extremidades dos valores dos intervalos de confiança do índice de função diastólica E/A entre os grupos EAo-leve e EAo-grave foi devida à grande variabilidade do índice.

Portanto, a utilização conjunta das variáveis que não apresentaram superposição, à exceção de DDVE e DSVE, permitirá separar ratos com estenose aórtica em dois graus distintos de disfunção ventricular com extrema segurança. Os

valores absolutos de DDVE e DSVE devem ser utilizados com cautela porque esses parâmetros habitualmente necessitam ser normalizados para o peso corporal dos animais.

Como já descrito nos resultados, algumas variáveis apresentaram superposição entre os grupos controle e estenose aórtica. Essa superposição é compreensível, levando em consideração a remodelação ventricular que se segue à colocação de clipe na aorta ¹².

Quanto ao comportamento dos índices de encurtamento do VE na progressão da estenose aórtica, inicialmente ocorre aumento de seus valores, seguido de normalização e posterior queda desses índices. Por esta razão, os índices de encurtamento muscular não apresentam superposição de seus valores entre os grupos controle e EAo-leve e apresentam-se superpostos nos grupos controle e EAo-grave.

Na tentativa de minimizar o efeito da hipertrofia miocárdica sobre o aumento na porcentagem de encurtamento entre o endocárdio do septo interventricular e da parede posterior do VE (%Enc.Endo), calculamos também a porcentagem de encurtamento entre os pontos centrais daquelas paredes (%Enc.Mio) ^{9,24}. No entanto, as conclusões não diferiram do índice %Enc.Endo, provavelmente devido ao intenso grau de hipertrofia ventricular. O índice de massa do VE foi a única variável que não apresentou superposição entre os três grupos. Em nosso estudo, a distinção entre grupos controle e com estenose aórtica pôde ser feita também pela medida da espessura da parede do VE (dados não apresentados).

Entretanto, esse método de seleção mostrou-se limitado, devido à dificuldade de se encaixarem, simultaneamente, os valores das variáveis ecocardiográficas obtidas, no mesmo grupo de disfunção (leve ou grave).

A partir desta dificuldade, selecionamos cinco variáveis ecocardiográficas que apresentaram nível de significância de $p < 0,001$ entre os grupos e que eram representativas de funções ventriculares sistólica (%Enc.Endo, %Enc.Mio e VEPP) e diastólica (AE/PC) e de repercussão morfométrica (IMVE) para obter uma função discriminante de acordo com a técnica de discriminação gráfica de Fisher, conforme descrito anteriormente. Com esse método, as variáveis foram analisadas, simultaneamente e permitiram a classificação funcional dos ratos em grupos controle (G1), disfunção leve (G2) e grave (G3), com precisão de 99,99%.

Esse estudo foi de grande importância para a classificação dos animais avaliados, quanto à função cardíaca, permitindo a obtenção de grupos mais homogêneos funcionalmente, para estudos longitudinais. Entretanto, é limitado a ratos com insuficiência cardíaca secundária à EAO, após o aparecimento de taquipnéia após, aproximadamente, a vigésima semana.

Concluindo, a função discriminante de Fisher, mostrou-se bastante eficiente para definir ratos com as mesmas características funcionais e pode ser aplicada a diversos trabalhos científicos.

5- REFERÊNCIAS

1. SJAASTAD, I. et al. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. **Journal of Applied Physiology**, v.89, p.1445-1454, 2000.
2. FRANCIS, J. et al. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v.281, p.1734-1745, 2001.
3. COLLINS, K.A.; KORCARZ, C.E., LANG, R.M. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. **Physiology Genomics**, v.13, p.227-239, 2003.
4. SATOH, S. et al. Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on sarcoplasmic reticulum function in the failing heart of the Dahl rat. **Circulation Journal**, v.67, p.705-711, 2003.
5. BREGAGNOLLO, E.A. et al. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.84, p.225-232, 2005.
6. OKOSHI, K. et al. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of *in vivo* and *in vitro* studies. **Nutrition Research**, v.22, n.11, p.1353-1364, 2002.
7. PAIVA, S.A.R. et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. **American Journal Physiology Heart and Circulation Physiology**, v.284, p.2242-2246, 2003.
8. PAIVA, S.A.R. et al. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.81, p.221-224, 2003.
9. REFFELMANN, T. KLONER, R.A. Transthoracic echocardiography in rats. Evaluation of commonly used indices of left ventricular dimensions, contractile performance, and hypertrophy in a genetic model of hypertrophic heart failure (SHHF-Mcc-facp-Rats) in comparison with wistar rats during aging. **Basic Research in Cardiology**, v.98, n.5, p.275-284, 2003.

10. LITWIN, S. et al. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. **Circulation**, v.89, p.345-354, 1994.
11. MOMKEN, I. et al. Does angiotensin-converting enzyme inhibition improve the energetic status of cardiac and skeletal muscles in heart failure induced by aortic stenosis in rats? **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.35, p.399-407, 2003.
12. RIBEIRO, H.B. et al. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supraavalvar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.81, p.562-568, 2003.
13. COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. <http://www.cobea.org.br>.
14. GONÇALVES, G. et al. O Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.84, p.304-308, 2005.
15. CARVALHO, R.F. et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **Internal Journal of Experimental Pathology**, v.84, n.4, p.201-206, 2003.
16. LITWIN, S.E. et al. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation**, v.91, p.2642-2654, 1995.
17. SIMONE, G. et al. In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. **Journal of Hypertension**, v.10, p.725-732, 1992.
18. DOUGLAS, P.S. et al. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. **Journal of American College of Cardiology**, v.32, n.4, p.1118-1125, 1998.
19. PADOVANI, C.R. **Análise de Agrupamento (“Cluster Analysis”)**. Publicação do Depto. Matemática e Estatística – ESALQ/USP, Piracicaba – SP, 1982. 16 p.
20. JOHNSON, R.A.; WITCERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**, 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 642p.
21. BUTZ, S. et al. Losartan but not enalapril acutely reduces reperfusion ventricular tachyarrhythmias in hypertrophied rat hearts after low-flow ischaemia. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, p.521-528, 2004.

22. HANSELL, A.L. Medical event profiling of COPD patients. **Pharmacoepidemiology Drug Safety**, v.13, p.547-555, 2004.
23. EBRAHIM, S.; MONTANER, D.; LAWLOR, D.A. Clustering of risk factors and social class in childhood and adulthood in British women's heart and health study: cross sectional analysis. **British Medical Journal**, v. 328, p.861-865, 2004.
24. BALLO, P. et al. Midwall mechanics in physiologic and hypertensive concentric hypertrophy. **Journal of American Society Echocardiography**, v.17, p.418-427, 2004.

CAPÍTULO 2

RESUMO

Estudos demonstraram que sobrecarga pressórica promove aumento de índices de fibrose no miocárdio, à semelhança do que ocorre na miocardiopatia isquêmica. Este achado foi associado à insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita. Observou-se que a administração dos hormônios do eixo GH/IGF-1, promoveu atenuação da fibrose intersticial do miocárdio e aumento da sobrevivência de ratos infartados. Além disso, em humanos, maiores concentrações sanguíneas de IGF-1, após o início do infarto agudo do miocárdio, associaram-se à melhora da função e remodelação ventricular. Desconhecemos estudos sobre os efeitos do GH sobre a fibrose e função miocárdica, concomitantemente, de ratos portadores de cardiopatia hipertrófica, causada por estenose aórtica (EAo).

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do GH sobre a fibrose e a função miocárdica de ratos portadores de estenose aórtica (EAo).

Realizou-se estudo *in vivo*, controlado, randômico de ratos Wistar machos, portadores de insuficiência cardíaca grave, secundária à EAo, assim distribuídos: Controle, EAo, EAo + GH (1 mg/kg/dia, 14 dias). A fibrose cardíaca foi avaliada no músculo papilar por imunohistoquímica e a função cardíaca pelo ecocardiograma. Utilizou-se a ANOVA one-way e teste de Tukey *post hoc*, com nível de significância de 5%.

Verificou-se significativa diminuição do índice de fibrose (56,9%) no grupo EAo+GH em relação ao EAo, sem alteração da função cardíaca.

Concluimos que a administração de GH, na dose de 1 mg/kg/dia, em ratos portadores de insuficiência cardíaca grave, secundária à EAo, promove atenuação da fibrose miocárdica e não altera a função cardíaca.

ABSTRACT

Studies have demonstrated that pressure overload increases fibrosis in the myocardium, similarly to what occurs in ischemic cardiomyopathy. This finding was associated with heart failure, arrhythmias and sudden death. It was observed that administration of hormones of GH/IGF-1 axis attenuated interstitial fibrosis and increased the survival of rats with myocardium infarction. Moreover, in human, high serum concentrations of IGF-1, measured just after myocardium infarction, were associated with improved ventricular function and remodeling. Accordingly to our knowledge there are no studies addressing the effects of GH in myocardium fibrosis in heart failure secondary to aortic stenosis. The objective of this study was to evaluate the effect of GH on myocardium fibrosis and function in aortic banded rats (AEs). In the present controlled and randomized study, Wistar male rats with severe heart failure secondary to AEs were distributed into the following groups: Control, AEs, AEs+GH (1 mg/kg/day, 14 days). Heart papillary muscle was evaluated for Fibrosis index by immunohistochemistry and myocardium function by echodopplercardiography. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc procedure were used to compare differences between groups of data. Significant reduction ($p < 0.05$) of fibrosis index was found (56.9%) in the AEs+GH group compared to [control /or AEs] but no significant alteration of the cardiac function. We conclude that administration of 1 mg/kg/day of GH in rats with severe heart failure secondary to aortic banded rats significantly reduced myocardium fibrosis but does not modify heart function evaluated by echocardiography.

INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca é um processo complexo e progressivo que ocorre em resposta a diferentes tipos de agressões cardíacas (isquemia, sobrecargas pressóricas ou volumétricas etc). Inclui alterações genéticas, moleculares, celulares e bioquímicas em diferentes compartimentos cardíacos, incluindo os cardiomiócitos e o interstício, que resultam em alterações estruturais e funcionais ^{1,2}. Dentre as alterações intersticiais, ocorre proliferação de fibroblastos, remodelação acelerada e aberrante da matriz extracelular, prevalecendo o acúmulo das proteínas da matriz, o que resulta em fibrose cardíaca ³.

Evidências clínicas indicam que a fibrose miocárdica é uma das características-chave da remodelação na doença cardíaca hipertensiva secundária a doença renovascular ou a estenose aórtica, dentre outras ^{3,4}.

Os mecanismos que promovem o desenvolvimento de fibrose cardíaca na doença hipertensiva cardíaca não são completamente conhecidos. Fatores hemodinâmicos (sobrecarga pressórica) e neurohumorais (angiotensina II e aldosterona e TGF-beta ⁵ podem contribuir para o seu desenvolvimento ^{3,5,6}. Outros fatores que, direta ou indiretamente, promovem fibrose, na doença hipertensiva, são apoptose e necrose miocárdicas ^{2,3,4,6,7,8}, que provocam defeitos no miocárdio, os quais são preenchidos por tecido fibroso ^{9,10}.

Observou-se que o desenvolvimento de fibrose precedeu o aparecimento de alterações funcionais cardíacas e progrediu com a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca, em ratos espontaneamente hipertensos ⁸ e no modelo de estenose aórtica ¹¹. O aumento da fibrose cardíaca causa hipertrofia ventricular esquerda, disfunções diastólica e sistólica, predispõe a arritmias e exacerba a isquemia miocárdica ^{3,7}. Deste modo, a fibrose cardíaca pode ser considerada fator de risco preditivo independente na insuficiência cardíaca ³ e pode modificar seu prognóstico. Portanto, a sua prevenção ou redução consiste em interessante alvo terapêutico ^{2,3,5,6,7}.

A importância da fibrose como um determinante da evolução da doença e do desempenho cardíacos tem recebido atenção crescente. No entanto, os esforços para desenvolvimento de novos fármacos que visam os fibroblastos cardíacos são ainda incipientes. Atualmente, os medicamentos aprovados para o tratamento da insuficiência cardíaca e que, provavelmente, exercem efeitos antifibróticos são os

inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, dentre estes, os inibidores da enzima conversora da angiotensina II, bloqueadores dos receptores de angiotensina II e antagonistas de aldosterona³. Os resultados de vários estudos sugerem que os efeitos benéficos desses medicamentos, na insuficiência cardíaca, derivam-se em parte de suas ações sobre os fibroblastos cardíacos e a remodelação fibrótica do coração³. No entanto, relatou-se um grupo de pacientes com insuficiência cardíaca, não responsivos aos efeitos antifibróticos dos bloqueadores dos receptores de angiotensina II³ ou que não toleram os inibidores de enzima conversora da angiotensina II, mostrando a necessidade de investigarem-se novos medicamentos que atuem nesse aspecto da remodelação cardíaca.

Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que o eixo GH/IGF-1 (hormônio de crescimento e fator de crescimento insulina-símile, tipo 1) influencia a síntese de colágeno e a fibrose. Concentrações séricas elevadas de GH suprimiram o aumento da fibrose cardíaca induzida por TNF-beta-induzida¹². Em diferentes estudos, em ratos com cardiomiopatia isquêmica, submetidos ao tratamento com GH (0,8 mg/Kg/d), observaram-se considerável aumento da densidade capilar; diminuição da concentração de colágeno I e III (em 50%) e da fibronectina (em 40%); aumento da laminina, relacionada ao crescimento, diferenciação, migração e hipertrofia dos cardiomiócitos⁹. Essa alterações associaram-se à melhora do relaxamento do ventrículo esquerdo, à diminuição da pressão diastólica final do VE e à melhora da função sistólica⁹. Em um estudo randômico, o tratamento de ratas jovens com doses farmacológicas de GH por, aproximadamente, 11 semanas, provocou diminuição da concentração de colágeno ventricular¹³.

Por outro lado, a administração de GH, por 7 dias, aumentou a proporção de colágeno na aorta e na musculatura cardíaca, em ratas jovens¹³. No entanto, a administração deste hormônio em ratas jovens, por 4 sem, não resultou no aumento do colágeno ou no índice de fibrose¹⁴.

Em portadores de deficiência de GH, mostrou-se diminuição do tecido conectivo, que aumentou com a suplementação de GH¹⁵. Em humanos saudáveis, submetidos a exercício físico, observou-se que a administração de GH (0,2UI/Kg) promoveu aumento de marcadores séricos de síntese de colágeno¹⁶. Por outro lado, níveis cronicamente elevados de GH, como observados em modelos experimentais e em humanos com acromegalia, podem induzir à fibrose intersticial^{17,18}, infiltrado mononuclear e áreas de necrose no coração, e em hipertrofia biventricular

concêntrica. Nos pacientes acromegálicos, em fase tardia, a fibrose intersticial constitui-se a principal anormalidade histológica miocárdica, que prejudica, gradualmente, a arquitetura e a função cardíaca^{19,20,21}. Observou-se também que em pacientes com excesso de GH e com massa ventricular normal, o conteúdo de colágeno no coração estava aumentado, precocemente¹⁷. No entanto, a exposição a altas concentrações sanguíneas de GH provoca o aparecimento de comorbidades, como diabetes melito e hipertensão arterial sistêmica, as quais podem induzir fibrose cardíaca *per se*⁹.

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o GH e/ou o IGF-1, interfere na indução da apoptose e necrose em vários tipos celulares^{18,22,23}. Em estudo, que avaliou ratos com insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio, observou-se significativa redução da apoptose e fibrose e aumento da sobrevivência após a administração de doses suprafisiológicas de GH, em uma fase inicial da lesão isquêmica²⁴.

Não encontramos na literatura estudos referentes ao efeito do GH sobre a fibrose em modelos de insuficiência cardíaca secundária à doença cardíaca hipertensiva.

Considerando-se os efeitos antiapoptótico e antifibrótico do GH, no modelo de miocardiopatia isquêmica e a importância da fibrose na doença hipertensiva, propusemos avaliar o efeito do GH sobre o conteúdo de colágeno no modelo experimental de estenose aórtica e suas conseqüências funcionais.

3 - OBJETIVOS

Avaliar o efeito do GH sobre o conteúdo de colágeno miocárdico e sua repercussão funcional em ratos portadores de insuficiência cardíaca grave, secundária à estenose aórtica.

3- MÉTODOS

O protocolo experimental desse estudo foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal²⁵.

3.1- ESTUDO

Foi realizado estudo *in vivo* controlado.

Utilizou-se um modelo animal de cardiopatia hipertrófica, secundário à sobrecarga ventricular esquerda, induzido por estenose aórtica.

3.2. ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal inicial de 70 a 80 g, provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas, 1 rato/caixa, à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de 12h. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com ração Labina e água *ad libitum*.

3.3. INDUÇÃO DA CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA POR EAo CIRURGIA

Para a indução da estenose aórtica, os animais foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz. Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual à pressão positiva^{26,27,28}.

3.4 CRITÉRIO PARA SELEÇÃO DOS ANIMAIS

A partir de 19 semanas da indução da estenose aórtica os animais foram observados diariamente para a detecção de taquipnéia. Assim que detectada, os ratos foram submetidos ao ecocardiograma. Então, os resultados ecocardiográficos foram utilizados para o cálculo da função discriminante e classificação da função cardíaca, descritos no **Capítulo 1**. Dentre os animais com EAo, selecionamos os que apresentavam insuficiência cardíaca grave para indicarmos, aleatoriamente, o tratamento com GH ou não. Os animais que, inicialmente, não se enquadraram nessa classificação foram submetidos à realização de novo(s) ecocardiograma (s), até atingirem estágio mais grave, quando então foram incluídos no estudo.

3.5 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Foi feita, antes e depois do tratamento, pelo mesmo observador, que desconhecia qual tratamento (GH ou não) foi administrado aos animais.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o exame foi realizado com o equipamento modelo Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co., equipado com transdutor eletrônico de 7,5 MHz. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando-se o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares^{29,30,31}. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas em modo-M foram registradas em impressora modelo UP-890 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro de precisão. Os valores das medidas das estruturas cardíacas representam a média aritmética de pelo menos 5 ciclos cardíacos consecutivos. Os diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE foram medidos no momento do ciclo cardíaco em que seus valores eram máximo e mínimo, respectivamente. As espessuras diastólicas e sistólicas da parede posterior (EDPP e ESPP) e do septo interventricular (EDSIV e ESSIV) foram medidas no momento em que a cavidade ventricular esquerda apresentava diâmetro máximo e mínimo, respectivamente. A medida da raiz da aorta (AO) foi realizada no instante imediatamente anterior à abertura da valva aórtica. O átrio esquerdo (AE) foi medido no momento em que seu diâmetro era máximo. A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada pela porcentagem de encurtamento sistólico (diâmetro diastólico – diâmetro sistólico) / diâmetro diastólico) e pela velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo. A função diastólica do VE foi avaliada pela razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral. A avaliação da disfunção diastólica e sistólica também foi baseada na relação do diâmetro do átrio esquerdo relativamente ao peso corporal

(PC). A hipertrofia ventricular esquerda foi avaliada pelo índice de massa ventricular esquerda e pela relação do diâmetro diastólico do VE relativamente ao PC.

As variáveis derivadas das dimensões acima descritas foram:

- espessura relativa do VE= EDPP/DDVE
- massa do VE (MVE, g)= $1,04 \times [(EDPP+EDSIV+DDVE)^3 - DDVE^3]$, onde 1,04 é a densidade específica do miocárdio.
- índice de MVE (IMVE, g/kg)= MVE/peso corporal
- porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. Endo.)= $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$
- porcentagem de encurtamento miocárdico (% enc. Mio.)= $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDSIV + \frac{1}{2} EDPP) - (DSVE + \frac{1}{2} ESSIV + \frac{1}{2} ESPP)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDSIV + \frac{1}{2} EDPP)\} \times 100$.
- velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP, mm/s): calculada a partir da tangente máxima do movimento sistólico do endocárdio da parede posterior do VE.

3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a avaliação da função cardíaca pelo ECO e sua classificação pela função discriminante de Fisher, os animais com EAo classificados como insuficiência cardíaca grave, foram submetidos ou não ao tratamento com hormônio de crescimento.

Foram utilizados 21 animais, distribuídos equitativamente entre grupos controle, EAo e EAo+GH.

Foi administrado o GH humano, à semelhança de outros estudos experimentais em ratos e nos quais se verificou efeitos cardíacos benéficos do hormônio^{14, 24, 31}.

Foi selecionada a dose de 1 mg/kg/dia, administrado por via subcutânea. Esta dose não provocou aparecimento de fibrose ou de efeitos hemodinâmicos indesejáveis, em ratos normais ou infartados, segundo os estudos avaliados^{9, 32,33}.

Selecionou-se o tempo de tratamento de duas semanas, devido ao potencial risco de desenvolvimento de anticorpos ao se administrar o GH humano, em animais, por mais de 3 semanas³⁴.

3.7. EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL DE ESTUDO

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

O coração foi dissecado e os músculos papilares foram retirados cuidadosamente do ventrículo esquerdo e imersos em formol para o estudo histológico.

Os ventrículos esquerdo e direito foram dissecados e pesados separadamente. As relações entre os pesos dos ventrículos esquerdo (PVE) e direito (PVD) sobre o peso corporal (PC) dos ratos (PVE/PC e PVD/PC) foram utilizadas como índices de hipertrofia dos ventrículos.

3.8. AVALIAÇÃO HORMONAL

Com o objetivo de se avaliar o efeito hormonal do GH, foram dosadas as concentrações séricas de IGF-1, coletadas após 12 horas da última injeção com GH, no grupo EAo+GH e seus controles (grupo controle e EAo).

As dosagens foram feitas no mesmo ensaio, em duplicata, empregando-se a metodologia de RIE (Kit comercial Mouse/rat IGF-1 RIA Referência: DSL 2900 – Diagnostic Systems Laboratories Inc.)

3.9- AVALIAÇÃO DE FIBROSE

Processamento Histológico

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

Imunoistoquímica

Cortes histológicos de músculo papilar de 4 µm de espessura foram obtidos e corados com a técnica de coloração picrosirius-red para quantificação da fibrose.

Foram selecionados 4 campos para cada amostra de músculo papilar, com a objetiva de 100X. Foram desprezados campos com fibras transversais, com cordoalhas tendíneas e porções de tecido que enrugaram no momento de fixação do tecido na lâmina.

Utilizou-se o programa Leica QWin V3, que calcula a fibrose em porcentagem (área de tecido colágeno em relação à área de tecido colágeno mais área de miócito X 100).

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

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada no Departamento de Bioestatística da UNESP. Empregou-se a ANOVA one-way, e teste de Tuckey pos hoc. Foi considerado o nível de significância de 5%.

4- RESULTADOS

No decorrer do estudo, 1 animal do grupo EAo+PI, e 2 animais do EAo+GH morreram. A mortalidade nesse modelo se dá principalmente devido a arritmias, isquemia subendocárdica e alteração da circulação coronariana^{28,35}.

Como as variáveis ecocardiográficas não apresentaram diferenças antes e após 2 semanas de observação, tanto no Grupo EAo quanto no EAo+GH, os resultados apresentados representam, apenas, os valores obtidos após 14 dias do tratamento.

A idade e o peso dos animais foram semelhantes entre os grupos estudados (**Tab.1**). Os níveis de IGF-1 no soro mostraram-se diminuídos no grupo EAo quando comparados ao grupo Controle. No grupo EAo+GH, esses níveis hormonais se elevaram em relação ao grupo EAo e normalizaram comparados ao Controle (**Tab.1**).

Tabela 1 – Características gerais (média±DP) dos animais após 2 semanas de tratamento com GH, 1 mg/kg/dia.

	Controle (n:7)	EAO (n:6)	EAO+GH (n:5)
Idade (sem)	37,43±2,82	36,00±3,16	38,6±1,52
Peso corporal(g)	529,68±27,34	476,27±66,12	490,28±35,35
IGF-1 (ng/ml)	1816,32±266,76a	837,12±211,27b	2108,10±689,15a

C, controle + placebo; EAO+PL, estenose aórtica + placebo; EAO+GH, estenose aórtica + hormônio de crescimento;

IGF-1, fator de crescimento insulina-símile, tipo 1

Letras representam a diferença estatística entre os grupos

Ausência de letras: não há diferença estatística

Em relação às variáveis ecocardiográficas estudadas, verificou-se que o grupo EAO+GH apresentou aumento de AE/PC e de IMVE comparativamente ao grupo C e valores semelhantes ao grupo EA. O grupo EAO apresentou VEPP significativamente menor em relação ao grupo C e semelhante ao grupo EAO+GH. Este último apresentou valores dessa variável semelhante ao grupo Controle. Não houve diferença entre % enc. endo, % enc. mio entre os 3 grupos. Não foi possível detectar-se diferenças entre os valores de E/A entre os 3 grupos (**Tab. 2**).

Tabela 2– Variáveis ecocardiográficas (média±DP) após 2 semanas de tratamento com GH, 1 mg/kg/dia.

	C(n:7)	Eao(n:6)	EAO+GH(n:5)
AE/PC (mm/kg)	10,87±0,78a	18,55±2,48b	17,68±3,44b
IMVE (g)	2,07±0,25a	3,62±0,57b	4,21±1,13b
VEPP (mm/s)	43,83±5,45a	31,46±2,32b	35,14±9,80ab
% Enc. Endo	51,69±5,39	50,52±8,02	47,32±10,06
% Enc. Mio	30,56±2,88	26,83±5,45	26,72±6,41
E/A*	1,36±0,35(7)	7,346±4,41(4)	8,54±3,74(3)

C, controle + placebo; EAO+PL, estenose aórtica + placebo; EAO+GH, estenose aórtica + hormônio de crescimento; AE/PC, átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; % Enc. Endo, % de encurtamento endocárdico; % Enc. Mio, % de encurtamento miocárdico; VEPP, velocidade de encurtamento da parede posterior; IMVE, índice de massa de ventrículo esquerdo

*não foi realizada análise estatística deste índice devido ao número reduzido de animais, que está descrito entre parênteses

Letras representam a diferença estatística entre os grupos

Ausência de letras: não há diferença estatística

As variáveis morfológicas A/PC e VE/PC apresentaram valores maiores no grupo EAo tratado ou não com GH, em relação ao Controle e valores semelhantes entre os grupos EAo e EAo+GH (**Tab. 3**).

Os índices de fibrose foram significativamente maiores no grupo EAo, tratados ou não com GH, em relação ao Controle. No grupo EAo+GH houve redução significativa desse índice (56,9%) em relação ao grupo EAo(**Tab. 3**).

Tabela 3– Dados anatômicos (média±DP) dos animais tratados com GH ou PL na dose de 1 mg/kg/dia, durante 14 dias.

	Controle(n:7)	EAo(n:6)	EAo+GH(n:5)
A/PC (mg/gr)	0,21±0,07a	0,56±0,15 b	0,70±0,29 b
VE/PC (mg/gr)	1,77±0,26a	3,13±0,85 b	3,31±0,48 b
VD/PC(mg/gr)	0,44±0,07a	1,03±0,28b	0,95±0,32b
Índice de fibrose (%)	1,88±0,88 a	10,34±1,29b	4,44±1,37c

C, controle + placebo; EAo+PL, estenose aórtica + placebo; EAo+GH, estenose aórtica + hormônio de crescimento; A/PC, átrios corrigido pelo peso corporal; VE/PC, ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal; VD/PC, ventrículo direito corrigido pelo peso corporal

Letras representam a diferença estatística entre os grupos

Ausência de letras: não há diferença estatística

5- DISCUSSÃO

Nesse estudo, avaliamos a influência do tratamento com GH sobre a fibrose cardíaca e suas conseqüências funcionais, em ratos portadores de insuficiência cardíaca grave, secundária à estenose aórtica.

Verificamos diminuição significativa das concentrações séricas de IGF-1 nos ratos com insuficiência cardíaca, secundária à EAo, à semelhança do que ocorre em outros modelos experimentais ou em humanos portadores de IC^{22,36,37,38,39}. Relatou-se que esta diminuição pode decorrer da redução ou resistência à ação do GH e pode influenciar negativamente a função e a morfologia do coração^{22,36,37,38,39,40}. Na primeira situação, doses suplementares seriam potencialmente eficientes para normalizar o estado hormonal e suas possíveis conseqüências cardiovasculares. Na segunda circunstância, seriam necessárias doses supra-fisiológicas para obterem-se

efeitos semelhantes ^{22,40}. Nesse estudo, utilizamos a dose de 1 mg/Kg/d, que foi suficiente para elevar significativamente os níveis séricos de IGF-1, no grupo tratado com GH, atingindo níveis semelhantes aos do controle (**Tab.1**). Isto sugere que a dose administrada não foi excessiva e que não houve resistência à ação do GH, no momento avaliado.

À semelhança do que foi observado em outros modelos experimentais e em humanos com sobrecargas pressórica ou volumétrica ^{8,3,35,26,41,42}, ocorreu aumento da fibrose nos ratos portadores de estenose aórtica, em estudo (**Tab.3**). Esta alteração foi implicada na transição da fase compensada da hipertrofia cardíaca para insuficiência cardíaca ¹¹. Deste modo, a avaliação de intervenções terapêuticas sobre esse aspecto da remodelação cardíaca é exequível nesse modelo.

Observamos que o tratamento de ratos portadores de EAo com GH, promoveu significativa diminuição da fibrose (56,9%). Semelhante efeito foi descrito em modelo de cardiopatia isquêmica, tratados com aquele hormônio ^{9,43}, mas não no de sobrecarga pressórica, segundo nosso conhecimento. Considerando-se a importância da redução da fibrose miocárdica no prognóstico na doença hipertensiva cardíaca, esse achado pode ter implicações terapêuticas significativas.

Os mecanismos envolvidos no efeito redutor do GH sobre a fibrose não foram esclarecidos. Apesar do objetivo desse estudo não abordar esse aspecto é possível postular algumas hipóteses baseada nas informações oferecidas por outros estudos.

O metabolismo do colágeno cardíaco resulta do equilíbrio entre a sua síntese e a degradação ⁵. Vários estudos mostraram que o GH pode interferir em um e/ou outro aspecto desse metabolismo em diferentes modelos experimentais ou clínicos.

Dependendo do modelo, da metodologia de avaliação do metabolismo de colágeno, das concentrações séricas e do tempo de exposição ao GH, mostrou-se que o GH induziu ao aumento ^{13,15,17,18}, diminuição ^{9,10,12,13} ou inalteração da síntese de colágeno ¹⁴. Em modelos experimentais de fibrose cardíaca induzida por TGF-beta ¹² ou em miocardiopatia isquêmica ^{9,43} o GH administrado em doses e tempos limitados, diminuiu a fibrose cardíaca. Uma das características em comum desses modelos é a presença de apoptose ou necrose dos cardiomiócitos que podem, secundariamente, levar ao preenchimento dos espaços estabelecidos por tecido fibroso ^{3,9,23}. Descreveu-se o efeito antiapoptótico da administração do GH no modelo de miocardiopatia isquêmica ^{9,43} e em humanos com cardiopatia dilatada ^{44,45}. Além disto, o GH mostrou efeito antagonico à sinalização do TGF-beta ¹²,

indutora de fibrose cardíaca³. Deste modo, considerando-se essas informações e a observação de que em modelos de miocardiopatia secundária à sobrecarga pressórica, incluindo o de EAO, ocorreu aumento de necrose e/ou apoptose^{8,9,23,43,44,46}, um dos mecanismos possíveis para explicar o efeito antifibrótico do GH, observado no presente estudo, seria a sua influência indireta sobre a síntese de colágeno, mediante a redução de apoptose ou necrose.

Em relação à degradação de colágeno, mostrou-se que a administração de GH em adultos com deficiência de GH, promoveu diminuição das metaloproteínases plasmáticas 2 e 9, as principais encontradas no miocárdio e responsáveis pela colagenólise⁴⁷. No entanto, observou-se que a exposição crônica a concentrações excessivas GH não aumentou a atividade de metaloproteínases em um modelo animal de acromegalia¹².

Além disto, o eixo GH/IGF-1 pode ter efeito imunomodulatório, favorecendo o aumento de citocinas antiinflamatórias séricas, envolvidas no aparecimento de necrose, apoptose e fibrose na insuficiência cardíaca^{2,12,44}, em detrimento das pró-inflamatórias^{45,46}. Desconhece-se o efeito do GH sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, também relacionado ao desenvolvimento de fibrose⁵.

Estudos experimentais ou clínicos mostraram que a diminuição ou a prevenção de fibrose promoveu melhora funcional cardíaca, principalmente diastólica^{2,3,4}, o que não foi observado no presente estudo. Esta diferença pode ser explicada, em parte, porque, diferentemente da maioria daqueles estudos, nos quais o GH foi utilizado como coadjuvante da terapia clássica de insuficiência cardíaca, neste, o hormônio foi administrado, isoladamente.

Além disto, o momento tardio de intervenção terapêutica com GH, realizado no presente estudo, pode ter influenciado no resultado funcional. Em ratos com cardiomiopatia dilatada, observou-se melhora funcional ao se administrar o GH aos 4 meses, mas não aos 10 meses²⁴. No modelo de miocardiopatia isquêmica, por exemplo, a administração precoce, imediatamente após a ligadura coronariana, de doses semelhantes à utilizada no presente estudo (0,8 mg/Kg/d), por 4 semanas, diminuiu a fibrose desenvolvida, provocou aumento da largura dos miócitos e melhora das funções sistólica e diastólica naqueles animais⁹.

Um dos fatores implicados na melhora da função cardíaca, após o tratamento com GH, em estudos experimentais de miocardiopatia isquêmica^{10,32,34} e, em várias observações clínicas^{47,48,49,50,51,52,53}, foi o seu efeito trófico sobre o miócitos⁵⁴.

Nesse estudo, apesar de não ter sido avaliada, é possível que tenha ocorrido hipertrofia dessas células. Essa possibilidade baseia-se na observação da semelhança dos indicadores ecocardiográficos (IMVE) e anatômicos (VE e VE/PC) de hipertrofia do VE entre os grupos de EAo tratados ou não com GH (**Tab.2 e 3**), apesar da significativa diminuição da fibrose no grupo tratado com o hormônio. Alguns consideram que hipertrofia adicional dos miócitos poderia ser prejudicial à função cardíaca ¹⁰. No entanto, não observamos piora funcional dos ratos EAo tratados com GH em relação ao placebo, corroborando o que foi mostrado em outros estudos em modelos de miocardiopatia isquêmica ^{10,28,55}. Por outro lado, a ausência de melhora funcional pode ter sido secundária à má qualidade funcional dos cardiomiócitos, encontrados nessa fase da remodelação cardíaca.

Em humanos, também há controvérsias quanto ao efeito funcional do GH em portadores de insuficiência cardíaca. Ao contrário do que foi observado em estudos não controlados ^{47,49,50,51,52,53,56}, a ausência de efeito funcional do GH foi relatada em estudos controlados e randômicos em portadores de insuficiência cardíaca ^{38,57,58,59}. Naqueles estudos, o tratamento com GH também foi instituído em fases muito tardias da remodelação cardíaca. Além disto, incluíram-se nesses estudos, pacientes com diferentes etiologias de miocardiopatia.

O modo como foi administrado o GH pode influenciar os resultados. Alguns autores mostraram que a administração do GH em pulsos induziu, mais eficazmente, a produção de IGF-1 em tecidos periféricos, como por exemplo o coração, em oposição ao fígado que é mais propenso a responder a contínuas doses de GH no plasma ³⁰. Em humanos, a administração venosa de 0,1 UI/Kg/d, por 24 horas, melhorou hemodinamicamente, portadores de insuficiência cardíaca, a maioria em classes funcionais Graus III de acordo com a New York Heart Association, de modo semelhante ao observado com a administração de dobutamina e inibidores da fosfodiesterase ⁴⁷. A administração intramuscular de 8 UI/d de GH, por 3 dias, também melhorou significativamente, um portador de insuficiência cardíaca refratária, a ponto de não necessitar de transplante cardíaco ⁵⁰. Em outro estudo, a administração de GH melhorou a capacidade de realização de exercícios em dois pacientes com insuficiência cardíaca grave ⁴⁹.

Outro fator que pode contribuir com as discrepâncias desses resultados funcionais é a variação do estado hormonal do eixo GH/IGF-1, previamente ao

tratamento, nos modelos experimentais ou em humanos portadores de insuficiência cardíaca ^{39,40,60}.

Independentemente de efeitos funcionais, a diminuição da fibrose pode atenuar a ocorrência de arritmias e de morte súbita e melhorar o prognóstico ^{2,3,7}. Observou-se que apesar de não ter ocorrido melhora funcional significativa, a administração precoce de GH (4 semanas, após a ligadura coronariana), por tempo limitado (4 semanas), promoveu diminuição da apoptose e fibrose de miócitos e aumentou a sobrevivência de ratos com cardiopatia isquêmica, após 13 semanas de observação ⁴³.

Deste modo, os resultados deste e dos estudos referidos sugerem que, devido ao seu significativo efeito redutor de fibrose, em diferentes modelos experimentais, a administração do GH poderia exercer papel coadjuvante na terapia da insuficiência cardíaca.

6 -CONCLUSÃO

O tratamento de ratos portadores de insuficiência cardíaca grave, secundária à estenose aórtica, com hormônio de crescimento, na dose de 1 mg/kg/dia, promove significativa redução da fibrose miocárdica e não altera a função cardíaca, avaliada ecocardiograficamente.

7. REFERÊNCIAS

1. COHN, J.N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, n.3, p.569-82, 2000.
2. REMME, W.J. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 17, p.349-360, 2003.
3. BROWN, R.D., et al. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. **Annual Revision of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.657-687, 2005.
4. BURLEW, B.S.; WEBER, K.T. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. **Herz**, v.27, n.2, p.92-98, 2002.
5. GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ, B.; DÍEZ, J. Fibrosis in hypertensive heart disease: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. **Medical Clinics of North America**, v.88, p.83-97, 2004.
6. BURLEW, B.S.; WEBER, K.T. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. **Cardiology Clinics**, v.18, n.3, p.435-42, 2000.
7. FROHLICH, E.D. Ischemia and fibrosis: the risk mechanisms of hypertensive heart disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.6, p.693-700, 2000.
8. OKOSHI, M. P. et al. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.9, p.1135-44, 1997.
9. GRIMM, D. et al. Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v.40, n.2, p.297-306, 1998.
10. CITTADINI, A. et al. Growth hormone attenuates early left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with large myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v.29, n.5, p.1109-1116, 1997.

11. RIBEIRO, H.B. et al. Estudo evolutivo da Morfologia e Função Cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supraavalar. *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*, v.81, n.6, p.562-8, 2003.
12. IMANISHI, R. et al. GH suppresses TGF- β - mediated fibrosis and retains cardiac diastolic function. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, v.218, p.137-146, 2004.
13. BRUEL, A.; OXLUND, H. The effect of growth hormone on rat myocardial collagen. ***Growth Hormone & IGF Research***, v.9, n.2, p.123-130, 1999.
14. CITTADINI, A. et al. Differential Cardiac effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in the rat. ***Circulation***, v.93, p.800-809, 1996.
15. DOESSING, S.; KJAER, M. Growth hormone and connective tissue in exercise. ***Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports***, v.15, p.202-210, 2005.
16. LONGOBARDI, S. et al. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. ***Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism***, v.85, n.4, p.1505-12, 2000.
17. BOGAZZI, F. et al. Improvement of intrinsic myocardial contractility and cardiac fibrosis degree in acromegalic patients treated with somatostatin analogues: a prospective study. ***Clinical Endocrinology***, v.62, p.590-596, 2005.
18. LI, Q. et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. ***Journal of Clinical Investigation***, v.100, n.8, p.1991-1999, 1997.
19. COLAO, A. et al. Growth hormone and the heart. ***Clinical Endocrinology***, v.54, n.2, p.137-154, 2001.
20. CUNEO, R.C. GH and cardiac failure. ***Journal of Clinical Endocrinology Metabolism***, v.86, n.10, p.4635-4637, 2001.
21. HAYWARD, R.P.; EMANUEL, R.W.; NABARRO, J.D. Acromegalic heart disease: influence of treatment of the acromegaly on the heart. ***Quarterly Journal of Medicine***, v.62, n.237, p.41-58, 1987.
22. CITTADINI, A. et al. Importance of an intact growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis for normal post-infarction healing: studies in dwarf rats. ***Endocrinology***, v.142, p.332-338, 2001.
23. BERANEK, J.T. Does growth hormone reduce fibrosis? ***Cardiovascular Research***, v.43, n.1, p.252-254, 1999.

24. RYOKE, T. et al. Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of GH and angiotensin-converting enzyme inhibition. **Circulation**, v.100, p.1734-1743, 1999.
25. COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. [http:// www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br).
26. GONÇALVES, G. et al. O Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.84, p.304-308, 2005.
27. CARVALHO, R.F. et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **International Journal of Experimental Pathology**, v.84, n.4 , p.201-206, 2003.
28. LITWIN, S.E. et al. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation**, v.91, p.2642-2654, 1995.
29. DOUGLAS, P.S. et al. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. **Journal of the American College of Cardiology**, v.32, n.4 , p.1118-1125, 1998.
30. ISGAARD, J. et al. Growth hormone improves cardiac function in rats with experimental myocardial infarction. **European Journal of Clinical Investigation**, v.27, n.6, p.517-525, 1997.
31. TIVESTEN, A. et al. Similar cardiovascular effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in rats after experimental myocardial infarction. **Growth Hormone & IGF Research**, v.11, p.187-195, 2001.
32. GROESBECK, M. D.; PARLOW, A. F. Highly improved precision of the hypophysectomised female rat body weight gain bioassay for growth hormone by increased frequency of injections, avoidance of antibody formation, and other simple modifications. **Endocrinology**, v.120, n.6, p. 2582-2590, 1987.
33. YANG, R.H. et al. Growth hormone improves heart function in rats with congestive heart failure. **Journal of Heart Failure**, v.1, p.793, 1993.
34. IIMOTO, D.S.; COVELL, J. W.; HARPER, E. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. **Circulation Research**, v.63, p.399-408, 1998.
35. BREGAGNOLLO, E.A. et al. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da

- hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.84, p.225-232, 2005.
36. BROGLIO, F. et al. Activity of GH/IGF-1 axis in patients with dilated cardiomyopathy. **Clinical Endocrinology**, v.50, p.417-430, 1999.
37. KONTOLEON, E. P. et al. Hormonal profile in patients with congestive heart failure. **International Journal of Cardiology**, v.87, p. 179-183, 2003
38. OSTERZIEL, K.J. et al. The severity of chronic heart failure due to coronary artery disease predicts the endocrine effects of short-term growth hormone administration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.85, n.4, p.1533-1539, 2000.
39. LEE, W. L. et al. Changes of the insulin-like growth factor I system during acute myocardial infarction: implications on left ventricular remodeling. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.84, n.5, p.1575-1581, 1999.
40. CICOIRA M, Kalra PR, Anker SD. Growth hormone resistance in chronic heart failure and its therapeutic implications. **Journal of the Cardiac Failure**, v.9, n.3, p.219-226, 2003.
41. MICHAEL, J.B. et al. Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. **Basic Research in Cardiology**, v.81, p. 142-154, 1986.
42. KHOURI, S. J. et al. A practical approach to the echocardiographic evaluation of diastolic function. **Journal of American Society of Echocardiography**, v.17, n.3, p.290-297,2004.
43. CITTADINI, A. et al. Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v.41, n.12, p.2154-2163, 2003.
44. ADAMAPOULOS, S. et al. Growth hormone administration reduces circulating proinflammatory cytokines and soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. **American Heart Journal**, v.144, n. 2, p. 359-64, 2002.
45. PARISSIS, J.T. et al. Growth hormone-induced reduction of soluble apoptosis mediators is associated with reverse cardiac remodelling and improvement of exercise capacity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 12, n. 2, p. 164-68, 2005.

46. ADAMAPOULOS S. et al. Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **European Heart Journal**, v. 24, n.24, p. 2186-96, 2003.
47. RANDEVA, H. S. et al. Growth hormone replacement decreases plasma levels of matrix metalloproteinases (2 and 9) and vascular endothelial growth factor in growth hormone-deficient individuals. **Circulation**. v. 109, n.20, p.2405-10, 2004.
48. MATTHEWS, K. G. et al. Cardiac IGF-1 manipulation by growth hormone following myocardial infarction. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 14, p. 251-260, 2004.
49. O'DRISCOLL JG, et al. Treatment of end-stage cardiac failure with growth hormone. **Lancet**. v.349, n.9058, p.1068, 1997.
50. BOCCHI, E.A. et al. Growth hormone for optimization of refractory heart failure treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.73, n.4, p.391-398, 1999.
51. GENTH-ZOTZ S. et al. Recombinant growth hormone therapy in patients with ischemic cardiomyopathy: effects on hemodynamics, left ventricular function, and cardiopulmonary exercise capacity. **Circulation**, v.99, n.1, p.18-21, 1999.
52. FRUSTACI, A. et al. Reversible dilated cardiomyopathy due to growth hormone deficiency. **Chest**, v.102, n.1, p.326-327, 1992.
53. SPALLAROSSA, P. et al. Evaluation of growth hormone administration in patients with chronic heart failure secondary to coronary artery disease. **American Journal of Cardiology**, v.84, n.4, p.430-433, 1999.
54. SACCA, L; NAPOLI, R.; CITTADINI, A. Growth hormone, acromegaly, and heart failure: an intricate triangulation. **Clinical Endocrinology**, v.59, n.6, p.660-671, 2003.
55. DUERR, R.L. et al. Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, n.2, p.619-627, 1995.
56. FAZIO, S. et al. A preliminary study of growth hormone in the treatment of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v.334, n.13, p.809-814, 1996.
57. PERROT, A. et al. Growth hormone treatment in dilated cardiomyopathy. **Journal of Cardiovascular Surgery**, v.16, n.2, p.127-131, 2001.

58. ACEVEDO, M. et al. Administration of growth hormone to patients with advanced cardiac heart failure: effects upon left ventricular function, exercise capacity, and neurohormonal status. **International Journal of Cardiology**, v.87, n.2/3, p.185-191, 2003.
59. ISGAARD, J. et al. A placebo-controlled study of growth hormone in patients with congestive heart failure. **European Heart Journal** , v. 19, n. 11, p. 1704-11, 1998.
60. GIUSTINA, A. et al. Endocrine predictors of acute hemodynamic effects of growth hormone in congestive heart failure. **American Heart Journal**, v.137, n.6, p.1035-1043, 1999.