

Efecto cardiopéptico del GHRP-6: caracterización mediante ecocardiografía *in vivo*

✉ Juan Valiente¹, Diana García del Barco², Gerardo Guillén², Héctor Santana², Fiorella Altruda³, Guido Tarone³, Lorenzo Silengo³, Jorge Berlanga²

¹ Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular
Calle 17 e/ A y Paseo, No. 702, Vedado, Plaza de La Revolución, CP 10400, La Habana, Cuba

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

³ Centro de Biotecnología Molecular, Universidad de Torino, Italia
✉ jvalient@infomed.sld.cu

RESUMEN

Una terapia farmacológica que incida en múltiples blancos de la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca es una necesidad clínica no satisfecha. Los péptidos secretagogos de la hormona de crecimiento se caracterizan por ejercer efectos cardiopépticos relevantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar, de manera experimental, el efecto del péptido 6 liberador de la hormona de crecimiento (GHRP-6) sobre la función cardíaca. Mediante la ecocardiografía bidimensional experimental, se evaluó el efecto cardiopéptico del GHRP-6 al administrar una dosis de 400 µg/kg en ratones Balb/c. Se estudió la respuesta en dependencia de la dosis: 100, 200 y 400 µg/kg, y el efecto sobre la función cardíaca en un grupo de animales que recibieron betabloqueo crónico con 30 mg/kg de metoprolol. El GHRP-6 incrementó la fracción de eyección ventricular izquierda, sin que aumentara la frecuencia cardíaca. El efecto inotrópico del GHRP-6 depende de la dosis y se mantiene, incluso, en los animales sometidos a betabloqueo crónico, sin que aumente la frecuencia cardíaca.

Palabras clave: GHRP-6, efecto inotrópico, ecocardiografía bidimensional experimental, insuficiencia cardíaca, isquemia-reperfusión miocárdica, cardioprotección

Biocología Aplicada 2013;30:280-284

ABSTRACT

Cardiotropic effect of GHRP-6: *in vivo* characterization by echocardiography. Up to date the search of pharmacological approaches to halt the complex pathophysiology of heart failure remains as an unmet clinical need. Growth hormone secretagogue peptides have been endowed with relevant cardiotropic properties. The aim of this work was to evaluate the cardiac effect of the growth hormone releasing peptide six (GHRP-6). Adult healthy Balb/c mice were intraperitoneally injected with GHRP-6 (400 µg/kg). Immediately after, a bidimensional echocardiography was conducted in order to characterize the ventricular ejection fraction. Three doses of GHRP-6 were tested (100, 200 and 400 µg/kg) and the concomitant effect between GHRP-6 and metoprolol (30 mg/kg) was assessed. GHRP-6 increased ventricular ejection fraction without any modification on heart rate. This inotropic effect was dose-dependent, and was sustained even in those animals chronically treated with metoprolol.

Keywords: GHRP-6, inotropic effect, experimental bidimensional echocardiography, heart failure, myocardial ischemia-reperfusion, cardioprotection

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de morbilidad y mortalidad en países desarrollados y en Cuba, con más de 17 millones de nuevos casos cada año [1, 2]. La cardiopatía isquémica y el infarto de miocardio, las formas clínicas más graves, incapacitan y provocan una elevada letalidad, a pesar de estrategias terapéuticas como la perfusión temprana [3]. Aunque en los últimos 20 años la mortalidad por cardiopatía isquémica ha disminuido, la incidencia y prevalencia de la insuficiencia cardíaca secundaria ha aumentado drásticamente, por lo que se ha convertido en la primera causa de hospitalización y mortalidad de personas mayores de 65 años [4]. El remodelado ventricular, como proceso de adaptación entre el daño y la reparación, como respuesta al daño miocárdico, incrementa el peligro de morbilidad y mortalidad en la población de alto riesgo posterior al infarto de miocardio [5].

La fisiopatología de remodelado ventricular incluye alteraciones en la expresión génica, modificaciones

moleculares, celulares e intersticiales [6, 7], que se manifiestan como cambios en el tamaño, la forma y la función del corazón luego de haber sufrido un daño [5, 8].

A pesar de la complejidad de este fenómeno, las únicas formas actuales para atenuarlo o revertirlo son la terapia farmacológica múltiple (con betabloqueadores, *i.e.*, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y bloqueadores de la aldosterona) [9-11], la terapia de resincronización ventricular, la terapia regenerativa y el trasplante de corazón. Además, muchas de ellas son asequibles solo para un reducido grupo de pacientes.

Por esas razones, la búsqueda de una terapia farmacológica única que incida en múltiples blancos de la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca, continúa siendo un reto para la cardiología. En tal sentido, los secretagogos naturales y sintéticos de la hormona de crecimiento pudieran ser eficaces, por sus cuantiosos efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular, que podrían cubrir esas expectativas.

1. Ministerio de Salud Pública, Cuba. Anuario estadístico de salud. La Habana: Dirección Nacional de Registros y Estadística de Salud; 2010. Available from: <http://files.sld.cu/dne/files/2011/04/anuario-2010-e-sin-graficos1.pdf>

2. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):e2-e220.

3. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-81.

4. Salazar HP, Talano JV. Viable myocardium: how much is enough? *Echocardiography*. 2005;22(1):59-70.

Entre los beneficios está el efecto vasodilatador y la reducción de la resistencia vascular periférica, el incremento en el flujo microvascular y en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, la mejora de la disfunción diastólica y el remodelado inverso [12-14]. Uno de los secretagogos más estudiados, el péptido seis liberador de la hormona de crecimiento (GHRP-6), pudiera ser un candidato terapéutico para la insuficiencia cardíaca posinfarto.

Resultados anteriores de nuestro grupo al evaluar el GHRP-6 en modelos experimentales de isquemia-reperfusión y de miocardiopatía dilatada [15, 16] confirman algunos de estos efectos. Por lo que efectuamos este nuevo estudio, con el objetivo de valorar, mediante ecocardiografía, la respuesta inotrópica positiva en animales tratados con GHRP-6, y a su vez investigar el efecto de este péptido sobre la función cardiovascular cuando se administra junto con otros medicamentos de uso frecuente en cardiología.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones machos de la línea Balb/c de 23 a 26 g de peso y de 8 a 10 semanas de edad (sucursal de Charles River Laboratories Italia). Se alojaron en una sala para roedores en el Bioterio del Centro de Biotecnología Molecular, de la Universidad de Torino, Italia. El trabajo con los animales de experimentación respetó las normas éticas y de seguridad biológica establecidas en esa institución. Los animales se mantuvieron en condiciones de clima e iluminación controladas, y con suministro de agua y alimentos *ad libitum*.

Péptido

El péptido GHRP-6 se sintetizó en los laboratorios BCN Peptides S.A. (Barcelona, España), lote PC0601, como sal de acetato. La molécula se almacenó a -20 °C, protegida de la luz, hasta el momento de ser diluida y administrada a los animales. El péptido GHRP-6 se diluyó en solución salina fisiológica. La dosis utilizada fue de 400 µg/kg de peso y se administró por vía intraperitoneal.

Anestesia

Los experimentos se efectuaron en condiciones controladas de anestesia volátil, que consistió en una mezcla de isoflurano y oxígeno medicinal mediante máscara facial para roedores. No se emplearon drogas miorrelajantes ni preanestésicas. La dosis de inducción anestésica fue de 2.5 mL y la de mantenimiento fue de 1.5 o 1 mL, para obtener un nivel anestésico superficial. Los animales se colocaron en decúbito supino y se fijaron a una plataforma hidráulica, desplazable mediante controles de posición. De este modo se lograron obtener los electrocardiogramas, mantener la temperatura del animal durante la investigación y la precisión durante la colocación y movilidad del transductor en la zona precordial. Este último estaba sujeto a un soporte hidráulico, con iguales controles de posicionamiento.

Estudios ecocardiográficos

Se obtuvieron imágenes bidimensionales guiadas por el modo M del ventrículo izquierdo, con un sistema

de ultrasonido Vevo 770™ High-Resolution Imaging System (Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Canadá), provisto de un transductor lineal, con arreglo de fase de 40 MHz, una frecuencia de hasta 250 cuadros por segundo en una imagen bidimensional, y una resolución axial de hasta 30 micras y tres zonas focales. Los análisis ecocardiográficos se efectuaron en una vista del eje largo paraesternal, mediante el programa Vevo 770 (versión 3.0.0, Visual Sonics Inc.), con una inclinación de 45° y la angulación caudal de la plataforma (Figura 1).

Parámetros y metodología analítica

Las variables ecocardiográficas bidimensionales fueron el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DdVI), el diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (DsVI), el grosor diastólico del septo interventricular y de la pared posterior, la fracción de acortamiento (FAC) y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Esta última se calculó mediante la ecuación de Teichold:

$$FEVI = VTD - \frac{VTS}{VTD} \times 100$$

donde: VTD, volumen telediastólico; VTS: volumen telesistólico

Las mediciones dependieron del electrocardiograma: las diastólicas en el pico de la onda R y las sistólicas en el pico de la onda T, con un promedio de 3 a 5 ciclos cardíacos consecutivos, de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía [17]. Las determinaciones se efectuaron con intervalos de 5 min, y comenzaron en el minuto cero previo a la administración del péptido, y posteriormente, a los 5, 10 y 15 min. Las mediciones en el estudio del efecto del betabloqueador se extendieron hasta 50 min.

Diseño experimental

Para la evaluación del efecto inotrópico del GHRP-6 se emplearon 18 ratones, distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 9 animales para recibir GHRP-6 o vehículo. Se les determinó el peso y la temperatura corporal, así como la frecuencia cardíaca y la respiratoria. Durante los exámenes, se monitoreó el ecocardiograma.

5. Verma A, Meris A, Skali H, Ghali JK, Arnold JM, Bourgoun M, et al. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction: the VALIANT (VALsartan In Acute myocardial iNfarction) Echocardiographic Study. JACC Cardiovasc Imaging. 2008;1(5):582-91.

6. Hwang JJ, Dzau VJ, Liew CC. Genomics and the pathophysiology of heart failure. Curr Cardiol Rep. 2001;3(3):198-207.

7. Mirotsoy M, Watanabe CM, Schultz PG, Pratt RE, Dzau VJ. Elucidating the molecular mechanism of cardiac remodeling using a comparative genomic approach. Physiol Genomics. 2003;15(2):115-26.

8. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process. Am J Cardiol. 1991; 68(14):127D-31D.

9. Velazquez EJ, Pfeffer MA, McMurray JJ, Maggioni AP, Rouleau JL, Van de Werf F, et al. VALsartan In Acute myocardial iNfarction (VALIANT) trial: baseline characteristics in context. Eur J Heart Fail. 2003;5(4):537-44.

10. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, et al. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. N Engl J Med. 2003;349(20):1893-906.

11. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. Lancet. 2000;355(9215):1575-81.

12. Benso A, Broglio F, Marafetti L, Lucatello B, Seardo MA, Granata R, et al. Ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues are cardioactive molecules with identities and differences. Semin Vasc Med. 2004;4(2):107-14.

13. Cao JM, Ong H, Chen C. Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. Trends Endocrinol Metab. 2006;17(1):13-8.

14. Xu XB, Pang JJ, Cao JM, Ni C, Xu RK, Peng XZ, et al. GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289(4):H1643-51.

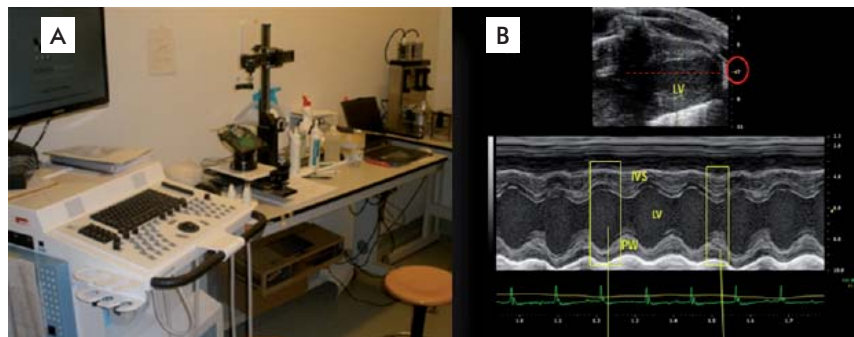


Figura 1. Sistema de ultrasonido Vevo 770™ High-Resolution Imaging System (Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Canadá) empleado para el estudio ecocardiográfico del efecto del GHRP-6 en ratones Balb/c. A) Plataforma hidráulica con soporte y brazo de sujeción del transductor. B) Imagen bidimensional y del modo M del ventrículo izquierdo en el eje largo paraesternal, para el cálculo de la fracción de eyección. IVS: Septo interventricular. LV: Ventrículo izquierdo. PW: pared posterior.

Para evaluar el efecto inotrópico del péptido dependiente de la dosis, se formaron cuatro grupos experimentales de 8 ratones cada uno. El grupo 1 recibió tratamiento con vehículo; el grupo 2, recibió 100 µg/kg de GHRP-6; el grupo 3 recibió 200 µg/kg de GHRP-6 y al grupo 4 se le administró la dosis máxima de 400 µg/kg de GHRP-6. En todos los grupos se efectuaron determinaciones ecocardiográficas en los tiempos cero o basal, cada 5 min y hasta 15 min, en iguales condiciones de sedación, temperatura y monitoreo.

Para evaluar los efectos de la coadministración del GHRP-6 y el betabloqueador metoprolol, se formaron dos grupos de 8 ratones cada uno, que recibieron metoprolol-vehículo o metoprolol-GHRP-6, respectivamente. Ambos grupos recibieron dos dosis diarias de 30 mg/kg de metoprolol (Seloken®, Holanda) [18] por vía subcutánea durante dos semanas. Al finalizar este periodo, coincidiendo con el día de las mediciones ecocardiográficas, ambos grupos recibieron la dosis de metoprolol correspondiente, y a los 15 min de esta administración, un grupo se inyectó con vehículo y el otro grupo recibió 400 µg/kg de GHRP-6 por vía intraperitoneal. Las determinaciones ecocardiográficas se efectuaron antes de la dosis de metoprolol y, posteriormente, cada 5 min hasta 50 min.

Análisis estadístico

Los resultados se procesaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Los datos se expresaron como medias, medianas y desviaciones estándares, según cada caso. El efecto de las dosis se estudió mediante un análisis de regresión lineal. La significación estadística se consideró para una $p < 0.05$.

Resultados

Efecto inotrópico positivo del GHRP-6 independiente del incremento de la frecuencia cardíaca

La administración sistémica del péptido GHRP-6 provocó un incremento significativo de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, que no se observó en el grupo control tratado con vehículo (Figura 2A). En el grupo tratado con GHRP-6 el incremento neto de la fracción de eyección fue muy significativo entre el tiempo cero y los 5 minutos ($p = 0.0035$). Este incremento se mantuvo hasta el final de la observación. El incremento promedio de la fracción de eyección en este grupo fue de 15 %. Los animales del grupo control de vehículo experimentaron un ligero aumento de la fracción de eyección que no superó el 5 %, lo cual está dentro del rango de la variabilidad intraensayo. La frecuencia cardíaca se mantuvo en un rango entre 450 y 500 latidos por minuto en ambos grupos experimentales (Figura 2B).

Efecto inotrópico del GHRP-6 dependiente de la dosis

La administración del GHRP-6 en dosis crecientes produjo un incremento sostenido y significativo de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, en las dosis de 200 y 400 µg/kg de peso, comparado con el grupo tratado con vehículo. El grupo que recibió una dosis de 100 µg/kg de GHRP-6 no se diferenció del

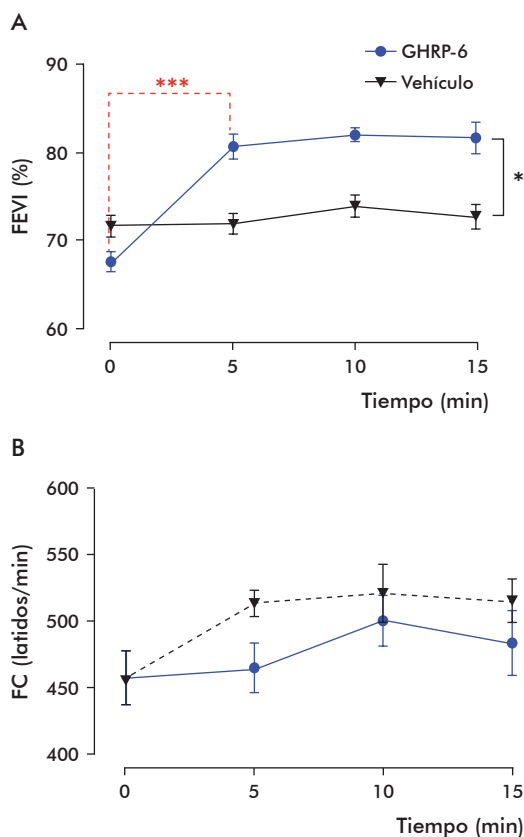


Figura 2. Efecto inotrópico del GHRP-6 en ratones Balb/c. A) Función sistólica del ventrículo izquierdo. B) Frecuencia cardíaca (FC). Los asteriscos indican diferencias estadísticas altamente significativas, mediante análisis de regresión lineal (***) $p = 0.00028$, * $p < 0.05$). En B) no hubo diferencias significativas ($p = 0.58$), según la prueba U de Mann Whitney. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

grupo control vehículo (Figura 3A). Este resultado se confirmó mediante un análisis de regresión lineal (Figura 3B).

Tomando como referencia los primeros 10 minutos posteriores a la administración de las diferentes concentraciones del GHRP-6, se demostró el incremento de su efecto inotrópico positivo, en dependencia de la dosis empleada (Figura 3C).

Efecto inotrópico del GHRP-6 en condiciones de betabloqueo crónico

La fracción de eyección promedio basal en los animales del grupo de tratamiento con metoprolol fue similar a la del grupo control no tratado. Posterior a la administración del día, previo a las determinaciones ecocardiográficas, se observó una caída significativa de la función sistólica del ventrículo izquierdo del 30 %, que se mantuvo durante los 15 min siguientes. La frecuencia cardíaca también se redujo hasta menos de 300 latidos/min. Al inyectar el GHRP-6 se constató un incremento significativo en la fracción de la eyección ventricular a los 5 min ($p = 0.02$), que ocurrió de manera progresiva hasta alcanzar valores de FEVI similares a los normales, y se mantuvo hasta el final de las observaciones (aproximadamente 40 min). Este efecto no se observó en el grupo control inyectado con

15. Berlanga J, Cibrian D, Guevara L, Domínguez H, Alba JS, Seralena A, et al. Growth-hormone-releasing peptide 6 (GHRP-6) prevents oxidant cytotoxicity and reduces myocardial necrosis in a model of acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond). 2007;112(4):241-50.

16. Cibrian D, Berlanga J, Guevara L, Valiente J, Guillén GE, García D, et al. Efecto citoprotector cardíaco y extracardiaco del péptido GHRP-6. Biotecnol Apl. 2008;25(3):276-8.

17. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification. Eur J Echocardiogr. 2006;7(2):79-108.

18. Tominaga M, Matsumori A, Okada I, Yamada T, Kawai C. Beta-blocker treatment of dilated cardiomyopathy. Beneficial effect of carvedilol in mice. Circulation. 1991;83(6):2021-8.

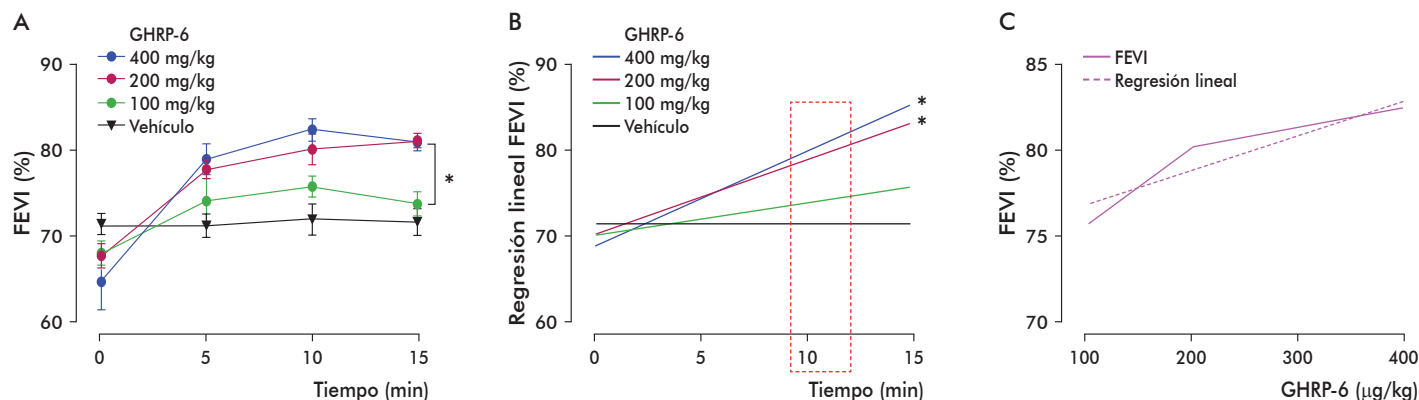


Figura 3. Estudio de dosis-respuesta para el efecto inotrópico tras la administración de tres dosis de GHRP-6 en ratones Balb/c. A) Curvas de respuesta del efecto inotrópico con tres dosis del GHRP-6. B) Regresión lineal de cada una de las curvas representadas en A). C) Curva de la relación dosis-respuesta a los 10 minutos del tratamiento con GHRP-6. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según las pruebas de Kruskal-Wallis (A) y de Dunn (B).

vehículo (Figura 4A). La frecuencia cardíaca se mantuvo muy por debajo del rango de normalidad para la especie (Figura 4B) [19].

Discusión

Este es el primer estudio ecocardiográfico bidimensional experimental que demuestra que el GHRP-6 provoca un incremento absoluto del inotropismo cardíaco en el corazón, evidenciado por el aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

La ecocardiografía bidimensional es una técnica apropiada para evaluar el efecto del GHRP-6 sobre la función cardíaca, pues los resultados son exactos y reproducibles, con una aceptable variabilidad intraobservador, y porque permite evaluar el corazón íntegramente.

Se demostró que la administración aguda del péptido GHRP-6 a ratones adultos provocó un aumento significativo de la función cardíaca, expresada como fracción de eyección, sin que se elevara la frecuencia cardíaca: efecto precoz que logra mantenerse en

el tiempo. También se evidenció que luego del uso crónico de un betabloqueador, el GHRP-6 incrementó la función ventricular sistólica.

Esta demostración pudiera ser relevante como aproximación terapéutica en la insuficiencia cardíaca y la cardiopatía isquémica, pues el efecto inotrópico positivo (*i.e.*, que favorece la contractilidad de la fibra muscular cardíaca) en ausencia de efecto cronotrópico positivo (*i.e.*, sin incremento en la frecuencia cardíaca), son beneficios terapéuticos deseables: se logra incrementar la función del miocardio, sin que aumente considerablemente el consumo de oxígeno. Este es un objetivo importante para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Hasta el momento, las opciones terapéuticas dirigidas a aumentar el inotropismo cardíaco solo se asocian con un incremento de la frecuencia cardíaca, mediado por la estimulación de receptores adrenérgicos [20, 21], que a su vez incrementan las demandas metabólicas del miocardio.

Se ha logrado incrementar la función del ventrículo izquierdo, reducir la frecuencia cardíaca y producir

19. Matsuki N, Sakuma Y, Saito H. Pharmacological properties of blood pressure and heart rate control in suncus. *Jpn J Pharmacol.* 1993;62(1):93-7.

20. Tacon CL, McCaffrey J, Delaney A. Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Med.* 2012;38(3):359-67.

21. Morici N, Sacco A, Oliva F, Ferrari S, Paino R, Milazzo F, et al. Epinephrine for acute decompensated heart failure and low output state: friend or foe? *Int J Cardiol.* 2011;149(3):384-5.

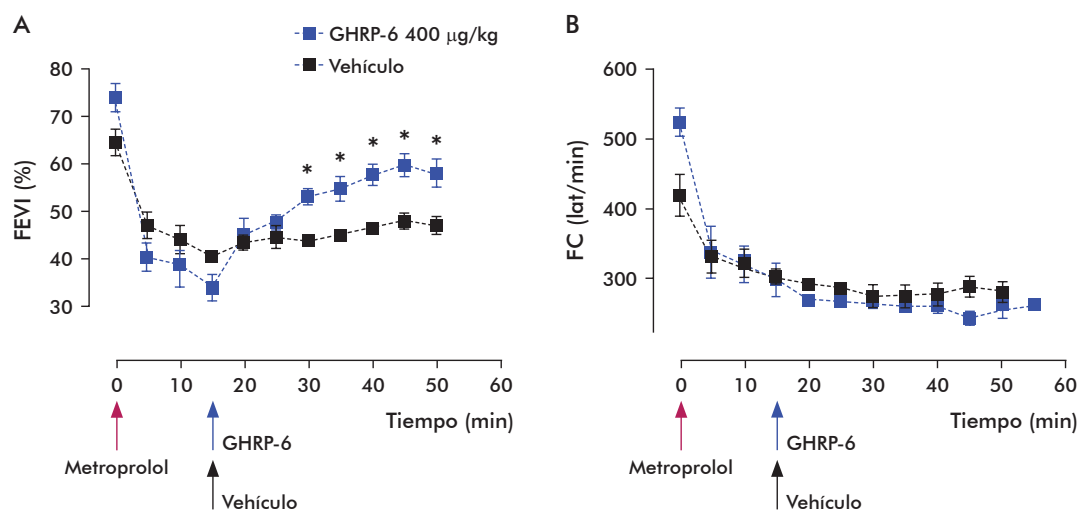


Figura 4. Efecto de la coadministración de metoprolol y GHRP-6 en la función y frecuencia cardíacas de ratones Balb/c. A) Efecto en la función cardíaca (fracción de eyección del ventrículo izquierdo, FEVI). Se realizó un ecocardiograma en tiempo 0 para establecer los parámetros basales del ensayo. B) Efecto en la frecuencia cardíaca (FC). Los datos se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en FEVI en el grupo que recibió metoprolol y GHRP-6 con respecto al grupo al que se le administró metoprolol más vehículo a los 30 min (* $p = 0.028$).

una vasodilatación en pacientes con insuficiencia cardíaca, mediante el tratamiento con combinaciones de drogas como aminos, betabloqueadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y aldosterona [9-11]. No obstante, el hallazgo de que con el GHRP-6 se pueda inducir inotropismo positivo y cronotropismo negativo representaría un beneficio indudable para la práctica cardiológica contemporánea.

A su vez, el incremento de la fracción de eyección en los animales sometidos a un betabloqueo crónico, sugiere que el efecto cardiopéptico del GHRP-6 no está mediado por la estimulación de receptores beta-adrenérgicos cardíacos, como ocurre con algunas aminos simpaticomiméticas. También indica que su efecto inotrópico positivo pudiera estar mediado por una vía distinta a la del estímulo de este tipo de receptor. Este otro resultado es inédito y podría justificar el empleo terapéutico del GHRP-6 para la insuficiencia cardíaca sistólica y como cardioprotector en los eventos de isquemia-reperfusión del miocardio. Evidencias experimentales previas han indicado que los efectos cardiopépticos del péptido GHRP-6 están mediados por la estimulación de dos tipos de receptores: el GHS-R1a y el CD36 [22], y recientemente se ha descrito que este

último receptor multifuncional endocítico de tipo B, media las acciones cardiopépticas del GHRP-6 [23].

Otro mecanismo involucrado en el incremento de la función cardíaca en modelos experimentales es la reducción de la resistencia vascular periférica [24]. Como en nuestro estudio no se exploró el efecto vasodilatador del GHRP-6 y otros autores han referido que moléculas similares al GHRP-6 inducen efectos vasomiméticos [25], ameritaría evaluar el posible efecto vasodilatador del GHRP-6. De demostrarse, incrementaría el beneficio potencial de esta molécula en el tratamiento a pacientes con insuficiencia cardíaca.

Conclusiones

Se demostró el efecto inotrópico positivo del GHRP-6 sobre las funciones cardíacas en ratones, mediante ecocardiografía bidimensional experimental. Este depende de la dosis empleada (100, 200 o 400 µg/kg), se mantiene en animales crónicamente tratados con betabloqueadores, y no se asocia con el efecto cronotrópico positivo. Por ello, se puede considerar el GHRP-6 como un candidato terapéutico potencial en la insuficiencia cardíaca severa y como cardioprotector en los eventos de isquemia-reperfusión miocárdica.

22. Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, Avallone R, Tulipano G, Cocchi D, *et al.* Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology*. 2003;144(5):1787-92.

23. Sun Q, Zang WJ, Chen C. Growth hormone secretagogues reduce transient outward K⁺ current via phospholipase C/protein kinase C signaling pathway in rat ventricular myocytes. *Endocrinology*. 2010;151(3):1228-35.

24. Tivesten A, Bollano E, Caidahl K, Kuja-cic V, Sun XY, Hedner T, *et al.* The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology*. 2000;141(1):60-6.

25. Isgaard J, Granata R. Ghrelin in cardiovascular disease and atherogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;340(1):59-64.

Recibido en febrero de 2013.

Aprobado en julio de 2013.

Cardiotropic effect of GHRP-6: in vivo characterization by echocardiography

✉ Juan Valiente¹, Diana García del Barco², Gerardo Guillén², Héctor Santana², Fiorella Altruda³, Guido Tarone³, Lorenzo Silengo³, Jorge Berlanga²

¹ Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular
Calle 17 e/ A y Paseo, No. 702, Vedado, Plaza de La Revolución, CP 10400, La Habana, Cuba

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

³ Centro de Biotecnología Molecular, Universidad de Torino, Italia
✉ jvalient@infomed.sld.cu

ABSTRACT

A pharmacological therapy aimed at the multiple targets exposed by the complex pathophysiology of heart failure remains an unmet clinical need. One possible solution is the use of growth hormone secretagogue peptides, which have important cardiotropic properties. The aim of this work was to conduct an experimental evaluation of the effect of growth hormone releasing peptide six (GHRP-6) on heart function. Bi-dimensional experimental echocardiography was used to evaluate the cardiotropic effect of GHRP-6 when 400 µg/kg were administered to Balb/c mice, measuring the ventricular ejection fraction. Dose-dependency was studied with dosages of 100, 200 and 400 µg/kg, and the effect of concomitant beta-blocker usage on the effect of this peptide was assessed in animals chronically treated with metoprolol at 30 mg/kg. GHRP-6 increased the left ventricular ejection fraction without changes on heart rate. This inotropic effect was dose-dependent, and was sustained even in animals chronically treated with metoprolol.

Keywords: GHRP-6, inotropic effect, experimental bidimensional echocardiography, heart failure, myocardial ischemia-reperfusion, cardioprotection

Biotecnología Aplicada 2013;30:285-289

RESUMEN

Efecto cardiotrópico del GHRP-6: caracterización mediante ecocardiografía *in vivo*. Una terapia farmacológica que incida en múltiples blancos de la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca es una necesidad clínica no satisfecha. Los péptidos secretagogos de la hormona de crecimiento se caracterizan por ejercer efectos cardiotrópicos relevantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar, de manera experimental, el efecto del péptido 6 liberador de la hormona de crecimiento (GHRP-6) sobre la función cardíaca. Mediante la ecocardiografía bidimensional experimental, se evaluó el efecto cardiotrópico del GHRP-6 al administrar una dosis de 400 µg/kg en ratones Balb/c. Se estudió la respuesta en dependencia de la dosis: 100, 200 y 400 µg/kg, y el efecto sobre la función cardíaca en un grupo de animales que recibieron betabloqueo crónico con 30 mg/kg de metoprolol. El GHRP-6 incrementó la fracción de eyección ventricular izquierda, sin que aumentara la frecuencia cardíaca. El efecto inotrópico del GHRP-6 depende de la dosis y se mantiene, incluso, en los animales sometidos a betabloqueo crónico, sin que aumente la frecuencia cardíaca.

Palabras clave: GHRP-6, efecto inotrópico, ecocardiografía bidimensional experimental, insuficiencia cardíaca, isquemia-reperusión miocárdica, cardioprotección

Introduction

Cardiovascular disease remains the principal cause of mortality and morbidity in both developed countries and Cuba, reaching a toll of over 17 million new cases per year [1, 2]. Its most severe clinical manifestations, ischemic heart disease and myocardial infarction, are incapacitating disorders with high mortality rates despite the availability of therapeutic alternatives such as early reperfusion [3]. Even though mortality due to ischemic heart disease has diminished during the last 20 years, the incidence and prevalence of heart failure arising from this condition have grown dramatically, becoming the first cause of hospitalization and death among persons older than 65 years [4]. Ventricular remodeling, an adaptive repair process that attempts to correct myocardial damage, actually increases mortality and morbidity after myocardial infarction in high-risk populations [5].

The physiopathology of ventricular remodeling involves an intricate network of variations in gene expression together with molecular, cellular and interstitial

modifications [6, 7] that all these produce changes in the size, shape and functional parameters of the damaged heart [5, 8]. Notwithstanding the complexity of this phenomenon, the range of therapeutic alternatives currently available is rather limited, essentially including the combination of pharmacological therapy (using beta-blockers, *i.e.* inhibitors of the Angiotensin converting enzyme and aldosterone blockers) [9-11], ventricular resynchronization therapy, regenerative therapy and heart transplant. To make matters worse, some of these alternatives are available only to a small group of patients.

Understandably, cardiologists have been looking for a single pharmacological therapy that can simultaneously hit many of the druggable targets exposed by the complex physiopathology of heart failure. From this point of view, natural or synthetic growth hormone secretagogues represent a potentially rewarding avenue of research, taking into account their beneficial effects on cardiovascular function. These include

1. Ministerio de Salud Pública, Cuba. Anuario estadístico de salud. La Habana: Dirección Nacional de Registros y Estadística de Salud; 2010. Available from: <http://files.sld.cu/dne/files/2011/04/anuario-2010-e-sin-graficos1.pdf>

2. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):e2-e220.

3. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-81.

4. Salazar HP, Talano JV. Viable myocardium: how much is enough? *Echocardiography*. 2005;22(1):59-70.

vasodilation and reduction of peripheral vascular resistance, increased microvascular flow, larger left ventricular ejection fraction, diminished diastolic dysfunction and inverse ventricular remodeling [12-14]. One of its most conspicuous examples, growth hormone releasing peptide 6 (GHRP-6), is a promising therapeutic candidate for post-infarction heart failure.

Previous results, obtained by evaluating GHRP-6 in experimental models of ischemia-reperfusion and dilated myocardiopathy [15, 16], confirmed many of these potential benefits. The present work intends, therefore, to evaluate echocardiographically whether the administration of GHRP-6 to experimental animals results in a positive inotropic response, and to examine the effect of this peptide on cardiovascular function when administered together with highly used cardiovascular drugs.

Materials and methods

Animals

The study employed male Balb/c mice weighing from 23 to 26 g, 8 to 10 weeks old (supplied by the Italian branch office of Charles River Laboratories). The animals were housed at a rodent room of the animal experimentation facility of the Center for Molecular Biotechnology of the University of Torino, Italy. Animal experimentation complied with all ethics and biosafety guidelines established by the institution. The mice were kept under controlled temperature, humidity and illumination, and received water and food *ad libitum*.

Peptide

Peptide GHRP-6 was synthesized at BCN Peptides S.A. laboratories (Barcelona, Spain). This study employed its acetate salt, with batch number PC0601. The molecule was stored protected from light at -20 °C until diluted for administration to the animals, using physiological saline solution as the solvent. The experimental animals received a maximum dose of 400 µg/kg body weight, administered through the intraperitoneal route.

Anesthesia

The experiments were conducted under controlled conditions of volatile anesthesia, consisting on a mixture of isoflurane and medicinal oxygen delivered with a facial mask for rodents. No muscle relaxants or pre-anesthetic drugs were used. Doses used were 2.5 mL for anesthetic induction and 1.5 or 1 mL for maintaining a superficial anesthetic effect. The animals were attached, on their backs, to a platform whose position was controlled hydraulically, in order to guarantee a stable body temperature during experimentation and to ensure adequate mobility and proper placement of the transducer on the precordial zone. The transducer was, likewise, attached to a hydraulically controlled mechanical support arm.

Echocardiography

Bi-dimensional M-mode ultrasound images were obtained with a Vevo 770™ High-Resolution Imaging System (Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Canada) fitted with a 40 MHz phased array linear transducer,

acquiring data at frequencies up to 250 frames per second with an axial resolution of up to 30 microns in three focal zones. Data processing and analysis were performed with the Vevo 770 software application (version 3.0.0, Visual Sonics Inc.), on a view of the long parasternal axis at an angle of 45° and the caudal angulation of the platform (Figure 1).

Analytical parameters and methods

Measured bidimensional echocardiographic variables measured were: left ventricular end diastolic dimension (LVEDD), left ventricular end systolic dimension (LVESD), interventricular septal end diastolic dimension (IVSd), left ventricular end diastolic posterior wall dimension (LVPWd), fractional shortening (FS) and left ventricular ejection fraction (LVEF). This last parameter was calculated with Teichold's equation:

$$LVEF = EDV - \frac{ESV}{EDV} \times 100$$

where: EDV, end-diastolic volume; ESV: end-systolic volume

Measurements were taken according to the specific echocardiogram: diastolic parameters were measured at the peak of the R wave, and systolic parameters at the peak of the T wave. They were performed across 3 to 5 consecutive cardiac cycles, following the recommendations of the American Society of Echocardiography [17]. The determinations were performed at 5 min intervals, starting from minute zero before administering the peptide and then at 5, 10 and 15 min. In the case of the effect of beta-blockers, measurements continued to be performed up to 50 min post-administration.

Experimental design

The inotropic effect of GHRP-6 was evaluated in 18 mice, randomly assigned to either of two groups of 9 individuals each, receiving GHRP-6 or excipient respectively. Body weight, temperature and heart rate were measured, monitoring the echocardiogram during the experiment.

The dose-response relationship of the inotropic effect of GHRP-6 was evaluated with four experimental groups containing 8 individuals each. Group 1 was administered only the excipient, group 2 received

5. Verma A, Meris A, Skali H, Ghali JK, Arnold JM, Bourgoun M, et al. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction: the VALIANT (VALsartan In Acute myocardial infarction) Echocardiographic Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2008;1(5):582-91.

6. Hwang JJ, Dzau VJ, Liew CC. Genomics and the pathophysiology of heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2001;3(3):198-207.

7. Mirotsov M, Watanabe CM, Schultz PG, Pratt RE, Dzau VJ. Elucidating the molecular mechanism of cardiac remodeling using a comparative genomic approach. *Physiol Genomics*. 2003;15(2):115-26.

8. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process. *Am J Cardiol*. 1991;68(14):127D-31D.

9. Velazquez EJ, Pfeffer MA, McMurray JJ, Maggioni AP, Rouleau JL, Van de Werf F, et al. VALsartan In Acute myocardial infarction (VALIANT) trial: baseline characteristics in context. *Eur J Heart Fail*. 2003;5(4):537-44.

10. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, et al. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med*. 2003;349(20):1893-906.

11. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*. 2000;355(9215):1575-81.

12. Benso A, Broglio F, Marafetti L, Lucatello B, Seario MA, Granata R, et al. Ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues are cardioactive molecules with identities and differences. *Semin Vasc Med*. 2004;4(2):107-14.

13. Cao JM, Ong H, Chen C. Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(1):13-8.

14. Xu XB, Pang JJ, Cao JM, Ni C, Xu RK, Peng XZ, et al. GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(4):H1643-51.

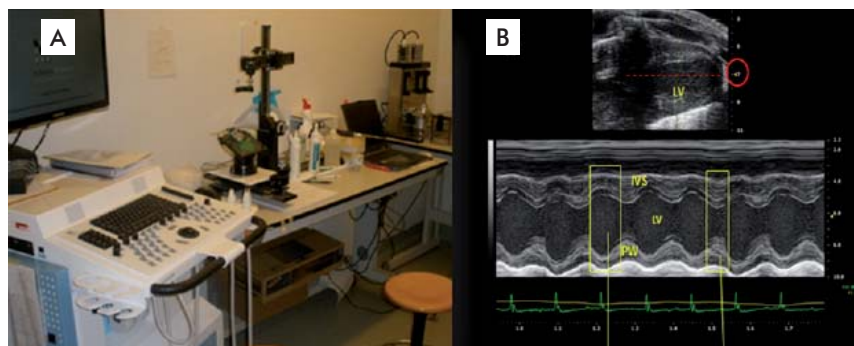


Figure 1. Vevo 770™ High-Resolution Imaging System (Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Canada), the ultrasound system used to study the echocardiographic effect of GHRP-6 in Balb/c mice. A) Hydraulically controlled support platform and transducer support arm. B) M-mode bi-dimensional image of the left ventricle corresponding to the long parasternal axis, used for calculating the ejection fraction. IVS: interventricular septum. LV: left ventricle. PW: posterior wall.

100 µg of GHRP-6 per kg of body weight, group 3 received 200 µg/kg of GHRP-6 and group 4 was administered the maximal dose of 400 µg/kg of GHRP-6. For every group, echocardiograms were obtained for time 0 or basal, and every 5 min afterwards until 15 min, under identical conditions of sedation, temperature and monitoring.

The effect of co-administering GHRP-6 and metoprolol (a beta-blocker) was determined using two groups of 8 mice, each receiving metoprolol-excipient or metoprolol-GHRP-6, respectively. In both cases, metoprolol (Seloken®, The Netherlands) [18] was first delivered subcutaneously in two daily doses of 30 mg/kg for a period of two weeks. At the end of this period, and coinciding with the last echocardiographic determinations, both groups were administered the corresponding metoprolol dose, and 15 min afterwards the metoprolol plus excipient group was administered the excipient via the intraperitoneal group, and the metoprolol plus GHRP-6 group received, in turn, 400 µg/kg of GHRP-6 using the same route. Echocardiographic determinations were performed before administering the last metoprolol dose, and later, every 5 min for a total of 50 min.

Statistical analysis

The data were analyzed using the statistical software package Prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Means, medians and standard deviations were calculated as necessary. The dose-response effect was analyzed by linear regression. Differences were considered to be statistically significant for $p < 0.05$.

Results

GHRP-6 has a positive inotropic effect but does not increase heart rate

The systemic administration of peptide GHRP-6 produced a significant increase in the left ventricular ejection fraction (LVEF), which was not observed in the group treated with excipient (Figure 2A). This increase was most significant between 0 and 5 min ($p = 0.0035$), and remained statistically significant until the end of the observation period. LVEF increased on average by 15 % on the treated group. By contrast, in the control group treated only with excipient, LVEF increased only slightly, always under 5 % (a magnitude within the range of intra-assay variability). Heart rate remained 450 to 500 beats per min in both experimental groups (Figure 2B).

The inotropic effect of GHRP-6 exhibits dose-dependency

The administration of increasing doses of GHRP-6 produced a sustained and statistically significant increase of the left ventricular ejection fraction in the groups receiving 200 and 400 µg/kg GHRP-6 when compared to the group receiving only the excipient. The difference was not statistically significant in the case of the group receiving a dose of 100 µg/kg (Figure 3A). This result was confirmed by linear regression (Figure 3B).

During the first 10 min after the administration of different doses of GHRP-6, the positive inotropic effect of this compound exhibits a clear dose-response

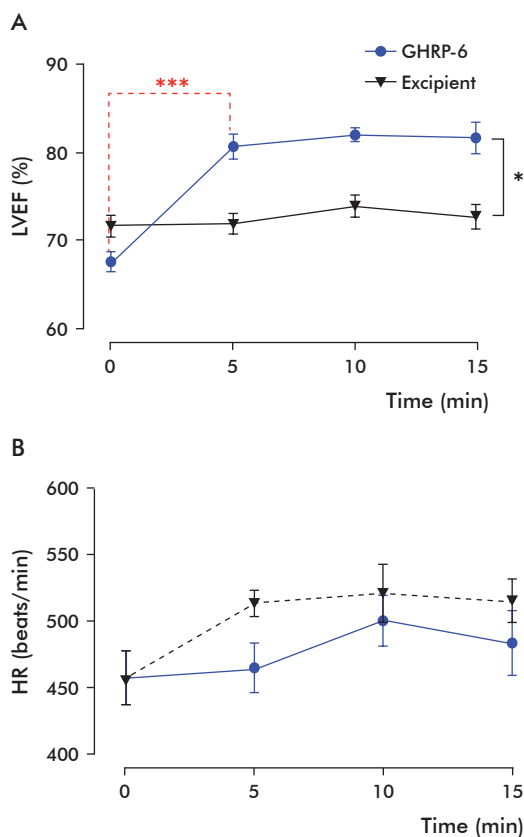


Figure 2. Inotropic effect of GHRP-6 in Balb/c mice. a) Left ventricular ejection fraction. b) Heart rate (HR). The asterisks indicate the existence of statistically significant differences between datasets, as determined by linear regression (** $p = 0.00028$, * $p < 0.05$). No statistically significant differences were detected in B) using Mann-Whitney's test ($p = 0.58$). LVEF: left ventricular ejection fraction.

behavior (Figure 3C).

Inotropic effect of GHRP-6 under chronic beta-blocker use

The average basal ejection fraction in the animals treated with metoprolol was similar to that of animals in the untreated control group. After the administration of the day and before the echocardiographic determinations, there was a significant, 30 % decrease in systolic function for the left ventricle, which was sustained for the following 15 min. Heart rate also dipped below 300 beats/min. The injection of GHRP-6 produced a statistically significant increase in the ventricular ejection fraction at 5 min ($p = 0.02$), which progressed until LVEF returned to normal values and remained so to the end of the observation period (approximately 40 min). This effect was not observed in the control group that was administered only the excipient (Figure 4A). Heart rate remained well below the lower bound of the normal range for this species (Figure 4B) [19].

Discussion

This is the first experimental bi-dimensional echocardiographic study demonstrating that GHRP-6 has a positive inotropic effect, as evidenced by the fact that its

15. Berlanga J, Cibrian D, Guevara L, Dominguez H, Alba JS, Seralena A, *et al.* Growth-hormone-releasing peptide 6 (GHRP-6) prevents oxidant cytotoxicity and reduces myocardial necrosis in a model of acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112(4):241-50.

16. Cibrian D, Berlanga J, Guevara L, Valiente J, Guillen GE, Garcia D, *et al.* Efecto citoprotector cardiaco y extracardiaco del péptido GHRP-6. *Biotechnol Apl*. 2008;25(3):276-8.

17. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, *et al.* Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr*. 2006;7(2):79-108.

18. Tominaga M, Matsumori A, Okada I, Yamada T, Kawai C. Beta-blocker treatment of dilated cardiomyopathy. Beneficial effect of carvedilol in mice. *Circulation*. 1991;83(6):2021-8.

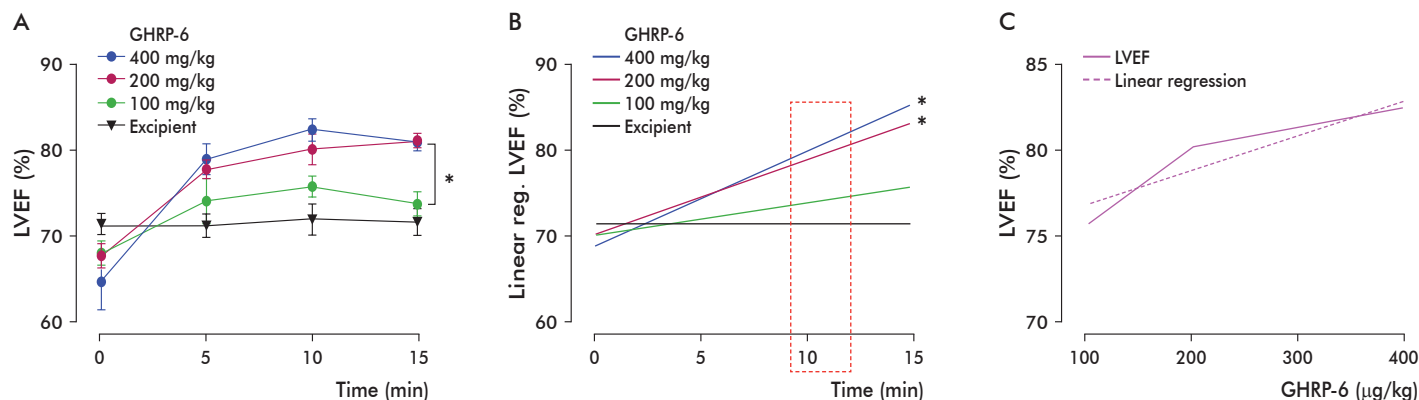


Figure 3. Dose-response dependence for the inotropic effect of GHRP-6 in Balb/c mice. A) Inotropic effect response curves for three different dosages of GHRP-6. B) Fitting of the data shown in panel A) to a straight line using linear regression. C) Dose-response curve for GHRP-6 at 10 min after administration. The asterisks indicate the presence of statistically significant differences ($p < 0.05$), as determined by the Kruskal-Wallis (A) and Dunn's (B) tests.

administration increases left ventricular ejection fraction. Bi-dimensional echocardiography is well suited to study the effect of this peptide on heart function, as it yields accurate, reproducible results with low intra-observer variability, affording the possibility of evaluating the heart as a whole.

It was demonstrated that the acute administration of peptide GHRP-6 to adult mice produced an early, significant increase in cardiac function (expressed as ejection fraction) that was sustained in time, without a concomitant increase in heart rate. The data also demonstrate that GHRP-6 can increase ventricular systolic function even in animals subjected to chronic treatment with a beta-blocker. The latter observation may hold significant value for the development of future therapeutic approaches to heart failure and ischemic cardiopathy in clinical settings, taking into account that a positive inotropic effect (*i.e.*, favoring the contractility of heart muscle) and the absence of a chronotropic effect (*i.e.*, no increase in heart rate) are desirable therapeutic outcomes. In other words, being

able to increase myocardial function without a significant increase in oxygen consumption affords an important clinical advantage in the treatment of heart failure. To put it into perspective, it must be noted that all clinically available positive inotropes also increase heart rate through the stimulation of adrenergic receptors [20, 21] that, in turn, increase myocardial metabolic demand.

In clinical practice, it is possible to increase left ventricular function while simultaneously reducing heart rate and achieving vasodilation in patients with heart failure by using combinations of drugs such as amines, betablockers, inhibitors of the angiotensin converting enzyme and aldosterone [9-11]. Nevertheless, the finding that GHRP-6 is both a positive inotrope and a negative chronotrope is no doubt highly beneficial for current cardiologic practice.

The fact that GHRP-6 increases the ejection fraction in animals under chronic treatment with a beta-blocker suggests that its cardiotropic effect does not depend on the stimulation of cardiac beta-adrenergic

19. Matsuki N, Sakuma Y, Saito H. Pharmacological properties of blood pressure and heart rate control in suncus. *Jpn J Pharmacol.* 1993;62(1):93-7.

20. Tacon CL, McCaffrey J, Delaney A. Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Med.* 2012;38(3):359-67.

21. Morici N, Sacco A, Oliva F, Ferrari S, Paino R, Milazzo F, et al. Epinephrine for acute decompensated heart failure and low output state: friend or foe? *Int J Cardiol.* 2011;149(3):384-5.

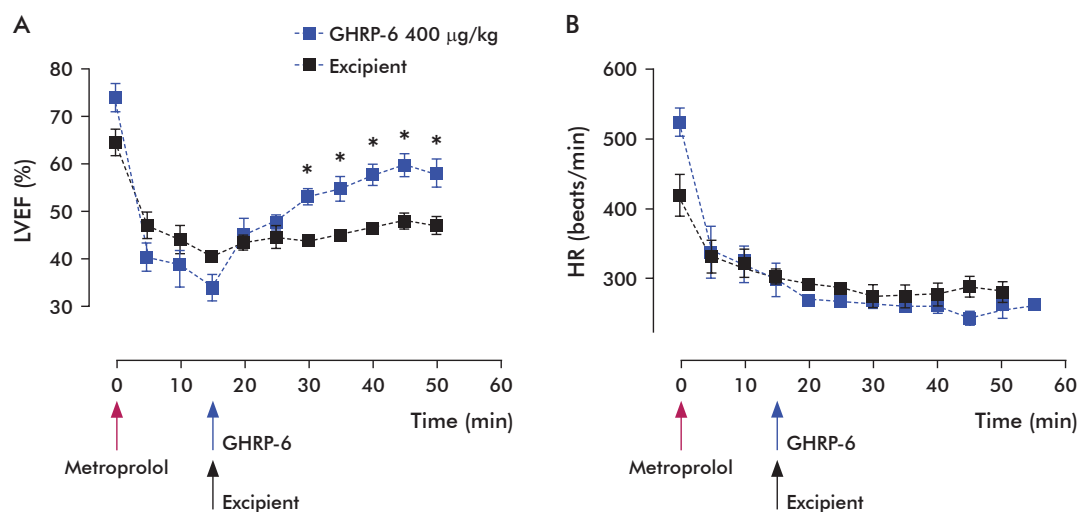


Figure 4. Effect on cardiac function and heart rate of the co-administration of Metoprolol and GHRP-6 to Balb/c mice. A) Effect on cardiac function (Left Ventricular Ejection Fraction, LVEF). Basal values for the assay were derived from echocardiograms at time zero. B) Effect on heart rate (HR). The data were compared using Mann-Whitney's test. There were statistically significant differences regarding LVEF at time = 30 minutes between the group receiving metoprolol plus GHRP-6 and the group receiving metoprolol plus excipient (* $p = 0.028$).

receptors, unlike drugs such as sympathomimetic amines. In addition, this also indicates that the positive inotropic effect of GHRP-6 may not depend on the stimulation of this type of receptor; a novel finding that strongly supports its potential application for the therapy of systolic heart failure and its use as cardioprotector in myocardial ischemia-reperfusion events. Such an inference is supported by previous experimental evidence indicating that the cardiotropic effects of GHRP-6 are mediated by the stimulation of two different receptors, namely GHS-R1a and CD36 [22], as well as by recent data involving the latter, a multifunctional type B endocytic receptor, in the cardiotropic action of GHRP-6 [23].

Heart function in experimental models may also improve through a reduction of peripheral vascular resistance [24]. Since the present study was not aimed at detecting vasodilation, and taking into account that

GHRP-6-like molecules have been previously shown to induce vasomimetic effects [25], we believe that focusing future research on evaluating whether GHRP-6 is in fact a vasodilator would be highly beneficial, as such a demonstration would no doubt increase the potential benefits of the application of this molecule to the therapy of heart failure.

Conclusions

It was demonstrated, using bi-dimensional experimental echocardiography, that GHRP-6 has a positive inotropic effect in mice. This effect is dose-dependent (100, 200 or 400 µg/kg), is detectable even under chronic beta-blocker usage, and is not associated to a positive chronotropic effect. Therefore, GHRP-6 can be considered as a potential therapeutic candidate for the treatment of severe heart failure and as a cardioprotector for myocardial ischemia-reperfusion events.

22. Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, Avallone R, Tulipano G, Cocchi D, *et al.* Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology*. 2003;144(5):1787-92.

23. Sun Q, Zang WJ, Chen C. Growth hormone secretagogues reduce transient outward K⁺ current via phospholipase C/protein kinase C signaling pathway in rat ventricular myocytes. *Endocrinology*. 2010;151(3):1228-35.

24. Tivesten A, Bollano E, Caidahl K, Kujacic V, Sun XY, Hedner T, *et al.* The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology*. 2000;141(1):60-6.

25. Isgaard J, Granata R. Ghrelin in cardiovascular disease and atherogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;340(1):59-64.

Received in February, 2013.

Accepted in July, 2013.