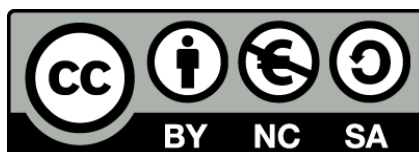




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Expressió miocardiaca d'IGF-1 i miostatina  
en donants hipertensos i amb consum excessiu  
d'alcohol. Relació amb el desenvolupament  
de miocardiopatia**

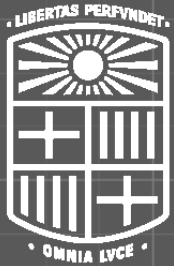
Francesc Borrissier Pairó



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

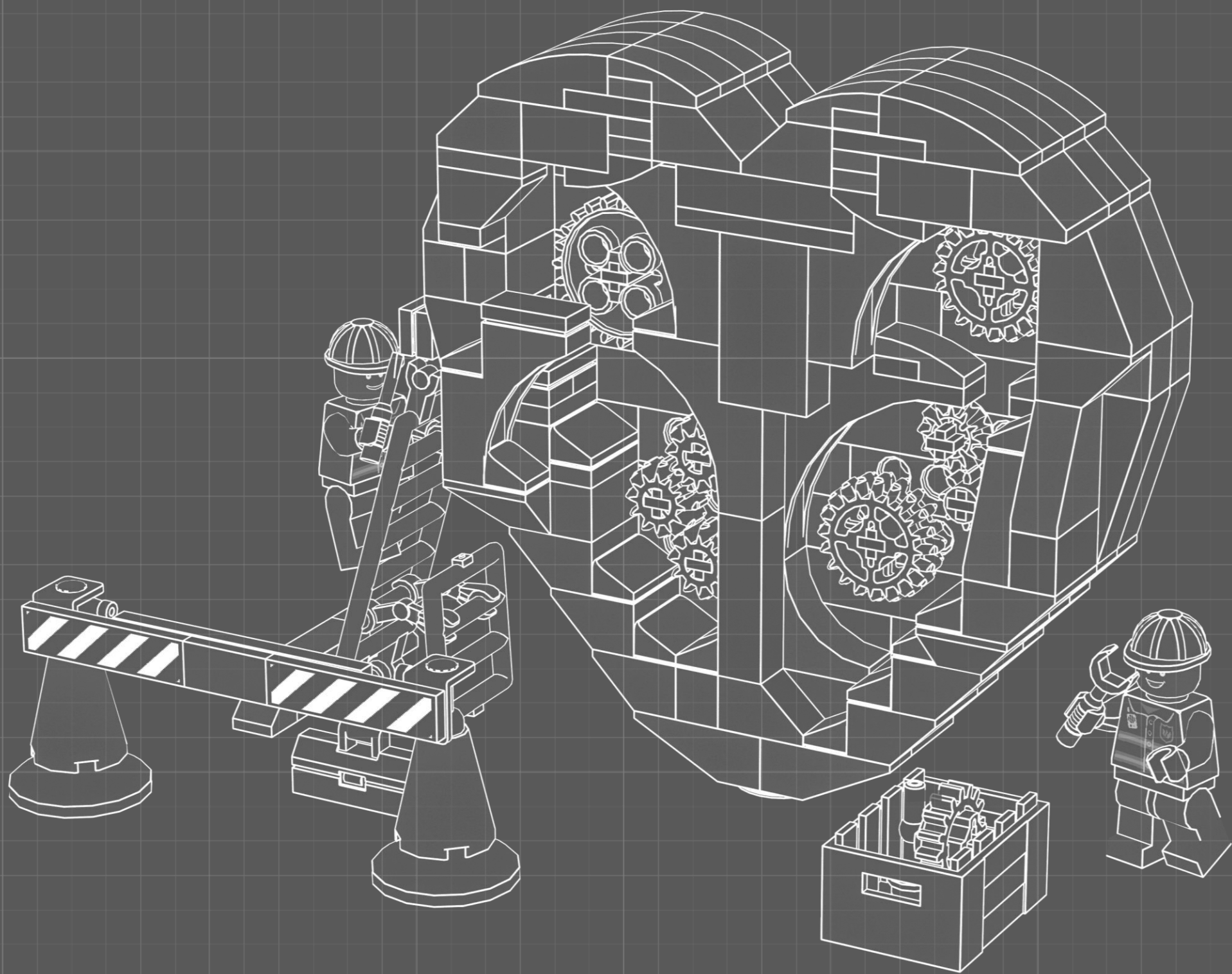
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## TESI DOCTORAL

Expressió miocardiàica d'IGF-1 i miostatina en donants hipertensos i amb consum excessiu d'alcohol.  
Relació amb el desenvolupament de miocardiopatia.



Francesc Borrissier Pairó

2019







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

TESI DOCTORAL

Expressió miocardiàca d'IGF-1 i miostatina en donants  
hipertensos i amb consum excessiu d'alcohol.  
Relació amb el desenvolupament de miocardiopatia.

Francesc Borrissier Pairó

2019

PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA I RECERCA TRANSLACIONAL

Dirigida per:

Dr. Joaquim Fernández Solà





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

El Dr. Joaquim Fernández Solà, catedràtic de Medicina del Departament de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona i Metge Consultor Senior del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Certifica:

Que el treball titulat "*Expressió miocardiàca d'IGF-1 i miostatina en donants hipertensos i amb consum excessiu d'alcohol. Relació amb el desenvolupament de miocardiopatia.*", que presenta Francesc Borrissier Pairó, ha estat realitzada sota la meva direcció i reuneix les condicions per a l'obtenció del Grau de Doctor.

**Dr. Joaquim Fernández Solà**

Barcelona, 2019





## **Agraïments: A review**

### ***Pròleg de l'autor***

Arribats a aquest punt podria fer un “copy/paste” i quedar-me tan ample, però com que no soc així de simple, intentaré fer un redactat coherent i documentat. De totes maneres, el faré a la meua manera i sense censura, com sempre acostumo a fer.

### ***Introducció***

Una tesi és un procés, un camí, un viatge, una aventura... s'ha definit de moltes maneres. Tot i que, en els seus agraïments, reconeguts autors enfoquen el procés d'elaboració d'una tesi de diferent manera, sempre hi ha uns punts en comú que s'intentaran analitzar en aquesta revisió.

Segons Glòria Garrabou Tornos (2008) una tesi és el més semblant a un llibre que hom pot escriure. María Rodríguez González (2009) considera difícil poder expressar en poques línies l'agraïment a totes les persones que ens han ajudat durant una tesi doctoral. Contanza Morén Núñez (2011) constata que la redacció d'uns agraïments no són difícils en el fet en sí de trobar el qui i el què, sinó per la dificultat en la plasmació en forma de paraules d'aquell agraïment sincer als que ens han ajudat en aquest procés. Núria Panella Riera (2011) defineix una tesi com un viatge que forma part d'un llarg aprenentatge tant a nivell humà com científic. Segons Gemma Chiva Blanch

(2012) en la defensa d'una tesi es posa fi a una bonica etapa de la vida amb, tot i els alts i baixos, un balanç positiu. Francesc García García (2013) veu el final d'una tesi com l'arribada a bon port després d'un llarg camí, un recorregut que s'ha compartit i patit amb molta gent a la qui agrair la seva ajuda. Marc Corbera Bellalta (2014) valora molt positivament l'apartat d'agraïments d'una tesi, ja que és aquell espai on pots dir el que vols dir a qui vols dir-ho, a més, es tracta d'un apartat que ve de gust escriure. Carmen L. (Mentxu) Manuelian Fusté (2014) veu la tesi com un treball en equip. Sarai Córdoba Terreros (2015) considera una tesi com el fruit de la sort que s'ha tingut durant el seu llarg camí. Ester Planas Rigol (2015) destaca la importància de les persones sense les que la tesi no hauria estat possible. Anna Carabús i Flores (2015) defineix una tesi amb el terme anglès *adventure*, i observa que tot i que pot sonar a clixé es fa difícil trobar les paraules per agrair a la gent que han estat amb nosaltres durant aquests 4 anys. Marc Catalán García (2017) considera que la realització d'una tesi pot canviar la vida per complet i que una carrera investigadora pot començar d'una manera tímida i discreta.

Francesc Borrissier Pairó (2016) ja va fer un anàlisi intens d'aquelles persones a les que agrair una etapa tesil, així que us remeto a la lectura d'aquella tesi per aprofundir en el tema. Tot i així, pels més mandrosos s'exposarà aquí un resum d'aquells agraiments.

### ***A qui agraeixo?***

En primer lloc a en **Quim**, el meu director i l'**Ester**, de ben segur que aquesta tesi no hauria estat possible sense ells, i també a en **JM Grau** ja que sense ell en Quim no m'hauria adoptat per fer aquell treball de màster, l'origen de tot plegat. Moltes gràcies pel suport, l'ajuda i la infinita paciència. Sense la gent de més avall potser alguna cosa hauria sortit (:P), però sense els de dalt segur que el tema estava ben cardat.

Als meus pares (**Rafel i Avelina**), al meu germà **Jordi** i a la **Maria**, a la meva àvia **Isabel** i a tota la meva família, els que hi són, als que ens han deixat i als que vindran. Als meus gats **Tuki i Min**, que ja no hi són, i la **Mini**. A l'**Albert**, la **Lídia**, la **Mentxu**, la **Natàlia**, la **Maria** i en **Raúl**. Com que durant aquesta etapa he estat a diversos llocs, i les coses d'una banda m'han servit per l'altra i a la inversa i del dret i del revés, he d'agrair l'ajuda, els consells i el suport a gent de tot arreu. A la gent del Lab 302 i 4B: la **Sarai**, en **Marc Suri**, l'**Ester Tobi** (again), la **Glòria**, la **Cons**, l'**Estereta**, en **Marc Culs**, la **Gemma**, la **Merxe**, la **Rosa**, la **Mireia**, la **Palmi**, en **Siscu**, la **Maria**, la **Nekane**, l'**Oriol**, la **Laura**, l'**Ester S**, la **Mariona**, la **Ingrid**, la **Gemma S**, l'**Àlex**, en **Vicente**, l'**Anna**, la **Diana** i segur que em deixo algú perquè per aquell lab ha passat un piló de gent. A la gent de l'IRTA: la **Núria**, la **M. Àngels**, la **Marta**, la **Maria**, la **Marina**, la **M. José**, l'**Agustí**, en **Joel**, l'**Albert B**, l'**Albert R**, l'**Anna**, en **Tiago**, en **Nicu**, en **Ricard**, i altra gent que segur que em deixo, també hi havia molta gent per allà.

## **Conclusions agraimentils**

Arribats aquí, podem veure com tothom tira més o menys per allà mateix: agrair l'aventura d'una tesi a aquells amb els que s'ha compartit. I com tot en la vida, al final només ens quedem amb els bons records, mentre que els dolents... dolents? Res, tot bo que jo recordi.

Moltes gràcies a tota la gent que m'ha ajudat, aguantat i suportat en  
les penes i alegries durant la confecció d'aquesta tesi!

## **Referències tesils**

Garrabou Tornos, G. (2008). *Mecanismes fisiopatològics de lesió mitocondrial secundària: antiretrovirals, antibiòtics, antipsicòtics i monòxid de carboni.*

URL: <http://hdl.handle.net/2445/42234>

Rodríguez González, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora.*

URL: <http://hdl.handle.net/10803/3931>

Morén Núñez, C. (2011). *Mitochondrial functionalism in HIV-infected children receiving antiretroviral therapy.*

URL: <http://hdl.handle.net/2445/34731>

Panella Riera, N. (2011). *Estratègies prèvies al sacrifici que poden afectar el benestar animal i la qualitat de la carn de porcs de diferent genotip RYR1.*

URL: <http://hdl.handle.net/10256/4477>

Chiva Blanch, G. (2012). *Balanç benefici / risc del contingut en polifenols i alcohol del vi: bases científiques dels efectes del consum moderat de vi sobre el sistema cardiovascular.*

URL: <http://hdl.handle.net/2445/42351>

García García, F. (2013). *Regulació del metabolisme de l'àcid araquidònic i senyalització cel·lular en un model d'asma i intolerància als AINEs.*

URL: <http://hdl.handle.net/10803/134760>

Corbera Bellalta, M. (2014). *Regulació de l'activitat inflammatòria per IFN-gamma en l'Arteritis de Cèl·lules Gegants (ACG).*

URL: <http://hdl.handle.net/2445/102662>

Manuelian Fusté, C. L. (2014). *Conditioned aversion to woody crops in small ruminants.*

URL: <http://hdl.handle.net/10803/285562>

Córdoba Terreros, S. (2015). *Genetic and molecular basis of reproductive efficiency in swine.*

URL: <http://hdl.handle.net/10803/377433>

Planas Rigol, E. (2015). *Endothelial and myointimal cell functions related to vascular inflammation and remodeling in Giant-Cell Arteritis Endothelial and myointimal cell functions related to vascular inflammation and remodeling in Giant-Cell Arteritis.*

URL: <http://hdl.handle.net/2445/109224>

Carabús i Flores, A. (2015). *Evaluation of live growing pigs of different genotypes and sexes using computed tomography.*

URL: <http://zaguan.unizar.es/record/47424>

Borrisser Pairó, F. (2016). *Anàlisi del potencial de mercat t de la carn procedent de porcs mascles sencers com a alternativa a la castració quirúrgica.*

URL: <http://hdl.handle.net/10256/13379>

Catalán García, M. (2017). *Mitochondrial profile and amyloidogenic molecules in sporadic inclusion body miositis.*

URL: <http://hdl.handle.net/2445/123724>



*Al meu futur nebot*





## **Llista de publicacions derivades de la tesi**

### **Article 1**

Francesc Borrissier-Pairó, Emilia Antúnez, Ester Tobías i Joaquim Fernández-Solà (2013). *Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption*. *Regenerative Medicine Research* 1(1): 3.

DOI: <https://doi.org/10.1186/2050-490X-1-3>

Índex de qualitat de la revista d'acord amb el JCR 2015: no inclosa

Projecció a JCR: 2 a la categoria General Medicine

Índex d'impacte: 3,873

### **Article 2**

Joaquim Fernández-Solà, Francesc Borrissier-Pairó, Emilia Antúnez i Ester Tobías (2015). *Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors*. *Journal of Hypertension* 33(4): 851-858.

DOI: <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000493>

Índex de qualitat de la revista d'acord amb el JCR 2015:

Índex d'impacte: 5,062

9/63 (1r quartil) a la categoria Peripheral Vascular Disease



**Abreviacions**

IGF-1: insulin-like growth factor-1

GH: hormona del creixement

HTA: hipertensió arterial

MCP: miocardiopatia

NYHA: New York Heart Association

SD: desviació estàndard



## Índex de figures

Figura 1. Classificació de les miocardiopaties primàries (Maron, <i>et al.</i> , 2006) .....	11
Figura 2. Miocardiopatia hipertròfica. Fets fisiopatològics rellevants.....	12
Figura 3. Miocardiopatia dilatada. Fets fisiopatològics rellevants. ....	15
Figura 4. Miocardiopatia restrictiva. Fets fisiopatològics rellevants. ....	17
Figura 5. Fisiopatologia de la hipertensió arterial (Kaplan i Flynn, 2006) .....	21
Figura 6. Distribució mundial del consum d'alcohol (WHO, 2018) .....	22
Figura 7. Esquema de l'afectació sistèmica produïda pel consum d'alcohol (Rusyn i Bataller, 2013).....	23
Figura 8. Correlació entre la dosi acumulada d'alcohol i la força muscular i la fracció d'ejecció ventricular (Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004) .....	25
Figura 9. Diferents efectes de l'etanol en l'estructura i els òrgans miocardiàcs (Modificat de Fernández-Solà (2015)) .....	28
Figura 10. Estructura tridimensional de la mol·lècula l' <i>Insuline-like Growth Factor-1</i> (Rose, <i>et al.</i> , 2018) .....	32
Figura 11. Esquema dels efectes de l' <i>Insuline-like Growth Factor-1</i> (IGF-1) sobre les cèl·lules.....	33
Figura 12. Estructura tridimensional de la mol·lècula de miostatina (Rose, <i>et al.</i> , 2018)	34
Figura 13. Comparació d'expressió miocardiàca d'IGF-1 entre els donants sans i els casos (P=0.007).....	62
Figura 14. Comparació d'expressió miocardiàca de miostatina i d'IGF-1 entre els donants no hipertensos i donants amb hipertensió arterial (*p<0.05).....	79
Figura 15. Comparació d'expressió miocardiàca de miostatina i d'IGF-1 entre els donants amb i sense miocardiopatia (**p<0.01).....	79



---

## Índex de taules

Taula 1. Miocardiopaties secundàries .....	18
Taula 2. Efectes nocius del consum crònic excessiu d'alcohol sobre el miocardi .....	27
Taula 3. Mecanismes de producció de dany miocardiàc per alcohol i els seus possibles efectors terapèutics .....	31
Taula 4. Dades clíniques i epidemiològiques dels diferents grups de donants .....	61
Taula 5. Comparació dels estudis immunohistoquímics en l'expressió d'IGF-1 entre els diferents grups de donants .....	63
Taula 6. Dades clíniques, epidemiològiques i troballes histològiques dels diferents grups de donants segons la presència d'hipertensió arterial .....	77
Taula 7. Comparació dels estudis immunohistoquímics en l'expressió de miostatina i d'IGF-1 entre els diferents grups de donants.....	78





## Índex

<i>Resum</i>	1
<i>Resumen</i>	3
<i>Abstract</i>	5
<b>Capítol I Introducció general</b>	<b>7</b>
I.1 Miocardiopaties	9
I.1.1 Definició de miocardiopatia	9
I.1.2 Miocardiopaties primàries	11
I.1.2.1 Miocardiopaties genètiques	11
I.1.2.1.1 Miocardiopatia hipertròfica	11
I.1.2.1.2 Miocardiopatia arritmogènica del ventricle dret	13
I.1.2.1.3 Absència de compactació del ventricle esquerre	13
I.1.2.1.4 Malaltia del sistema de conducció	14
I.1.2.1.5 Canalpaties de ions	14
I.1.2.2 Miocardiopaties mixtes (genètiques i no genètiques)	15
I.1.2.2.1 Miocardiopatia dilatada	15
I.1.2.2.2 Miocardiopatia restrictiva	16
I.1.2.3 Miocardiopaties adquirides	17
I.1.2.3.1 Miocarditis	17
I.1.2.3.2 Miocardiopatia de l'estrès ("Tako-Tsubo")	17
I.1.3 Miocardiopaties secundàries	18
I.2 Hipertensió arterial	19
I.2.1 Epidemiologia de la hipertensió	19
I.2.2 Fisiopatologia de la hipertensió	20
I.3 Consum excessiu d'alcohol	21
I.4 Fisiopatologia de la lesió miocardiàca	25
I.5 Factors de creixement	31
I.5.1 Insulin-like Growth Factor-1	32
I.5.2 Miostatina	34
I.6 Influència de la hipertensió arterial i el consum excessiu d'alcohol sobre el dany cardíac	35
<b>Capítol II Hipotesi i Objectius</b>	<b>37</b>
<i>Hipòtesi de treball</i>	39

<i>Objectiu general</i>	40
<i>Objectius específics</i>	40
<b>Capítol III Metodologia</b>	<b>41</b>
III.1 Selecció de donants i controls	43
III.2 Presa de mostres de miocardi	45
III.3 Tècnica immunohistoquímica per IGF-1	45
III.4 Tècnica immunohistoquímica per miostatina	46
III.5 Valoració microscòpica	46
III.6 Anàlisi estadístic	47
<b>Capítol IV Resultats</b>	<b>49</b>
IV.1 Article 1: Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption	51
IV.1.1 Resum dels principals resultats obtinguts en l'estudi d'IGF-1	61
IV.2 Article 2: Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors	65
IV.2.1 Resum dels principals resultats obtinguts en l'estudi d'hipertensió	77
<b>Capítol V Discussió general</b>	<b>81</b>
V.1 Discussió alcohol – IGF-1	83
V.2 Discussió hipertensió – IGF-1 i Miostatina	86
V.3 Limitacions de l'estudi	91
<b>Capítol VI Conclusions generals</b>	<b>93</b>
<b>Capítol VII Bibliografia</b>	<b>97</b>
<b>Annex 1</b>	<b>109</b>

## Resum

Les miocardiopaties són malalties cardíques d'etiologia molt diversa, entre les quals hi trobem la miocardiopatia hipertensiva i la miocardiopatia alcohòlica. La hipertensió arterial és una de les principals causes d'insuficiència cardíaca crònica. El consum crònic d'alcohol té efectes negatius sobre l'organisme: fetge, aparell digestiu, sistema neurològic i sistema cardiovascular. El dany cardíac causat per aquests factors (hipertensió i consum d'alcohol) està regulat per factors de creixement com l'*insuline-like growth factor-1* (IGF-1) i la miostatina. En cas de dany miocardiàc, el cor té mecanismes compensatoris per tal de revertir-lo. En aquesta tesi s'analitzaran els efectes de la hipertensió arterial i el consum crònic d'alcohol sobre l'expressió miocardiàca d'IGF-1 i miostatina. Per a l'execució d'aquesta tesi, es disposava de teixit cardíac de donants dividits en diferents grups (sans, amb hipertensió, amb consum crònic d'alcohol i amb altres causes de miocardiopatia). Es va estudiar l'expressió miocardiàca d'IGF-1 i de miostatina mitjançant immunohistoquímica per a cada grup de donants. El consum excessiu d'alcohol en pacients que no presenten dany miocardiàc disminueix l'expressió d'IGF-1. Els donants afectats de miocardiopatia (hipertensiva o alcohòlica) presenten un augment en l'expressió de miostatina. Aquests resultats obren la porta a un objectiu terapèutic amb IGF-1 i miostatina per tal de controlar el dany cardíac causat per la hipertensió o el consum d'alcohol.



## Resumen

Las miocardiopatías son enfermedades cardíacas de etiología muy diversa, entre las cuales se encuentran la miocardiopatía hipertensiva y la miocardiopatía alcohólica. La hipertensión arterial es una de las principales causas de insuficiencia cardíaca crónica. El consumo crónico de alcohol tiene efectos negativos sobre el organismo: hígado, aparato digestivo, sistema neurológico y sistema cardiovascular. El daño cardíaco causado por estos factores (hipertensión y consumo de alcohol) está regulado por factores de crecimiento como el *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) y la miostatina. En caso de daño miocárdico, el corazón tiene mecanismos compensatorios para revertirlo. En esta tesis se analizarán los efectos de la hipertensión arterial y el consumo crónico de alcohol sobre la expresión miocárdica de IGF-1 y miostatina. Para el desarrollo de esta tesis, se disponía de tejido cardíaco de donantes divididos en diferentes grupos (sanos, con hipertensión, con consumo crónico de alcohol y con otras causas de miocardiopatía). Se estudió la expresión miocárdica de IGF-1 y miostatina mediante inmunohistoquímica para cada grupo de donantes. El consumo excesivo de alcohol en pacientes que no presentan daño miocárdico disminuye la expresión de IGF-1. Los donantes afectados por miocardiopatía (hipertensiva o alcohólica) presentan un aumento en la expresión de miostatina. Estos resultados abren la puerta a un objetivo terapéutico con IGF-1 y miostatina con el fin de controlar el daño cardíaco causado por la hipertensión o el consumo de alcohol.



## **Abstract**

Cardiomyopathies are cardiac diseases of various causes, among them hypertensive cardiomyopathy and alcoholic cardiomyopathy. Arterial hypertension is one of the main causes of cardiac failure. Chronic alcohol consumption has negative effects in the body: liver, digestive system, neurological system and cardiac system. The cardiac damage caused by these factors (hypertension and alcohol consumption) is regulated by growth factors such as insuline-like growth factor-1 (IGF-1) and myostatin. In case of cardiac damage, the heart has some compensatory mechanisms to revert them. In this thesis the effects of arterial hypertension and chronic alcohol consumption on IGF-1 and myostatin cardiac expression. Cardiac tissue from donors was available (healthy, with hypertension, with alcohol consumption and with other causes of cardiomyopathy). Excessive alcohol consumption in patients without cardiac damage decreases IGF-1 expression. Myocardial expression of IGF-1 and myostatin was studied for each group of donors. Donors affected by cardiomyopathy (hypertensive or alcoholic) presented an increase on myostatin expression. These results open the door to a therapeutic objective with IGF-1 and myostatin to control the cardiac damage caused by hypertension or alcohol consumption.







Capítol I

**Introducció general**

---



## **I.1 Miocardiopaties**

Les miocardiopaties són un grup de malalties del múscul cardíac d'etiologia molt diversa i amb expressió heterogènia (Maron, *et al.*, 2006). La definició i la classificació dels diferents tipus de miocardiopaties és difícil degut a aquesta diversitat de causes i manifestacions clíniques. En els darrers anys l'exercici de classificar i agrupar les diferents miocardiopaties segons diferents criteris ha permès aprofundir en la seva comprensió fisiopatològica (Maron, 2008).

### **I.1.1 Definició de miocardiopatia**

Les miocardiopaties són malalties del miocardi que comporten una afectació funcional i estructural del cor. Diferents informes de la comissió de la *World Health Organization* i la *International Society and Federation of Cardiology Taskforce* (WHO/ISFC, 1980, Richardson, *et al.*, 1996, WHO/ISFC, 1996) van definir el concepte de miocardiopatia i en van classificar les diferents tipologies. De totes maneres, tot i que aquests informes han ajudat a comprendre millor les miocardiopaties, la seva classificació ha anat evolucionant i l'any 2006 la *American Heart Association* amb la participació de diferents experts va fer un informe per tal d'actualitzar-ne la definició (Maron, *et al.*, 2006). Aquest informe defineix les miocardiopaties de la següent manera:

*Les miocardiopaties són un grup heterogeni de malalties del miocardi associades amb una disfunció mecànica i/o elèctrica que normalment (però no sempre) exhibeix una hipertròfia o dilatació ventricular que és deguda a una varietat de causes sovint genètiques. Les miocardiopaties poden estar focalitzades al cor o poden ser part de desordres sistèmics, que sovint condueixen a mort cardiovascular o incapacitat lligada amb insuficiència cardíaca progressiva.*

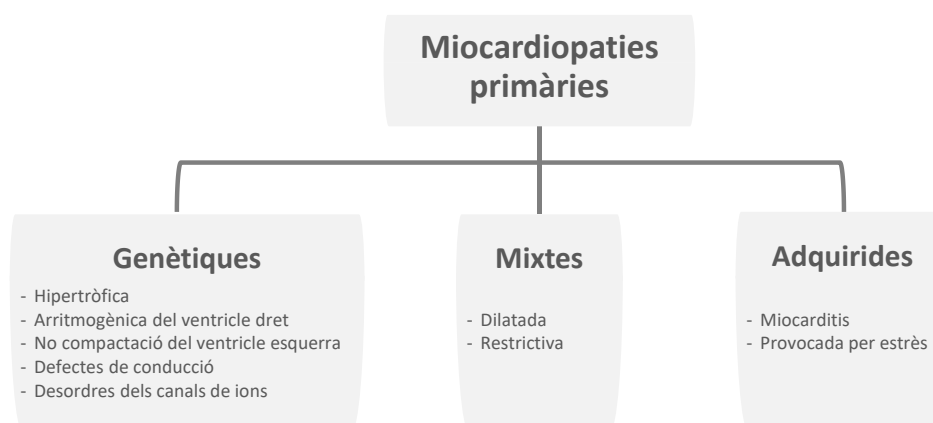
La classificació de les malalties del miocardi és molt complexa degut a la diversitat en les etiologies i les formes de presentació. Les diverses classificacions proposades s'han enfocat en classificar les miocardiopaties en funció de l'origen, l'anatomia, la fisiologia, la histopatologia, el mètode diagnòstic o la simptomatologia (Maron, *et al.*, 2006). De totes maneres, degut a la complexitat de la malaltia, qualsevol classificació pot comportar una superposició entre les diferents categories de malaltia. Així doncs, en qualsevol classificació que es faci serà difícil limitar d'una manera molt concreta les categories.

En funció del principal òrgan afectat la classificació proposada per Maron *et al.* (2006) divideix les miocardiopaties en 2 grups: primàries i secundàries. Les miocardiopaties primàries són aquelles que afecten principalment el cor, mentre que les secundàries impliquen afectació d'altres òrgans. La distinció

entre primàries i secundàries és difícil i arbitrària ja que depèn també de la clínica de cada cas.

### I.1.2 Miocardiopaties primàries

Les miocardiopaties primàries són aquelles on el principal òrgan afectat és el cor. Aquestes miocardiopaties s'han dividit en funció de si l'origen és genètic o no genètic, d'aquesta manera es classifiquen en: genètiques, mixtes (genètiques i no genètiques) i adquirides (**Figura 1**).



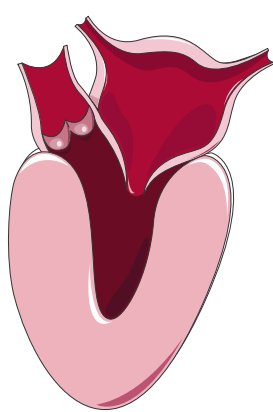
**Figura 1. Classificació de les miocardiopaties primàries (Maron, et al., 2006)**

#### I.1.2.1 Miocardiopaties genètiques

##### I.1.2.1.1 Miocardiopatia hipertròfica

La miocardiopatia hipertròfica (**Figura 2**) és probablement la més freqüent i comuna (1:500). Segons dades d'Estats Units, és la causa més freqüent de mort sobtada en individus de qualsevol edat. La miocardiopatia hipertròfica

es produeix quan hi ha un engruiximent del múscul cardíac sense dilatació ventricular i normalment afecta les parets ventriculars (normalment el ventricle esquerre) i el septe (WHO/ISFC, 1996, Maron, *et al.*, 2006). Aquest engruiximent fa que el pas de la sang sigui més estret i que hi puguin haver bloquejos als ventricles, fet que acabarà fent més difícil el bombeig de la sang als diferents òrgans i el ventricle haurà de treballar més fort. Els símptomes que poden donar-se en pacients amb miocardiopatia hipertròfica són dolor toràctic, dispnea o síncope.



Engruiximent de la paret del ventricle  
Disminució del pas de sang  
Enduriment de la paret del ventricle  
Incapacitat del cor per bombejar  
Increment de la pressió arterial

**Figura 2. Miocardiopatia hipertròfica. Fets fisiopatològics rellevants.**

Pot haver-hi també una afectació a la vàlvula mitral produint un retorn inadequat de sang a través d'aquesta vàlvula. Quan l'engruiximent del múscul cardíac no bloqueja el pas de sang fora del ventricle esquerre, produeix el que es coneix com a miocardiopatia hipertròfica no obstructiva. Tant en la miocardiopatia hipertròfica obstructiva com en la no obstructiva, la llum del ventricle és més petita pel que es bombeja menys sang. Les parets s'endureixen i el cor no es relaxa adequadament i no es pot emplenar

correctament de sang. Tot això pot fer augmentar la pressió arterial en els ventricles i en els vasos pulmonars, a més de produir defectes en els senyals elèctrics del cor derivant en arrítmies.

Les causes de miocardiopatia hipertròfica són sovint hereditàries, causades per alguns gens en proteïnes musculars del cor. La diabetis o malalties del tiroides també poden derivar en aquesta miocardiopatia. A més, com ja s'ha comentat, acostuma a presentar-se juntament amb hipertensió arterial. Aquesta última patologia (hipertensió arterial) és la que s'estudiarà en detall en aquesta tesi.

#### *1.1.2.1.2 Miocardiopatia arritmogènica del ventricle dret*

Es tracta d'una miocardiopatia genètica molt poc freqüent (1:5000) que s'ha descrit fa pocs anys (Maron, *et al.*, 2006). La miocardiopatia arritmogènica es produeix quan el teixit muscular del ventricle dret es substitueix per teixit fibrós. En un 75% dels pacients s'associa amb miocarditis. Aquesta patologia pot afectar els senyals elèctrics del cor i causar arrítmies. També es tracta d'una causa freqüent de mort sobtada en individus joves.

#### *1.1.2.1.3 Absència de compactació del ventricle esquerre*

Es caracteritza per una particular morfologia esponjiforme del ventricle esquerre (Maron, *et al.*, 2006). A la part distal del ventricle hi ha uns sinus

que comuniquen amb la cavitat ventricular. Es tracta d'una malformació congènita que es produeix durant el desenvolupament embrionari. Pot ser una troballa sense patologia o associar-se amb altres anomalies congènites del cor. Es diagnostica mitjançant un electrocardiograma 2D, una ressonància magnètica del cor o amb una angiografia de ventricle esquerre. Pot derivar en disfunció diastòlica, fallada cardíaca, tromboembòlia, arrítmies o mort sobtada.

#### *1.1.2.1.4 Malaltia del sistema de conducció*

Es coneix com a defecte de conducció cardíac progressiu i es caracteritza per un eixamplament del complex QRS que deriva en bradicàrdia i pot acabar en síncope (Maron, *et al.*, 2006).

#### *1.1.2.1.5 Canalpaties de ions*

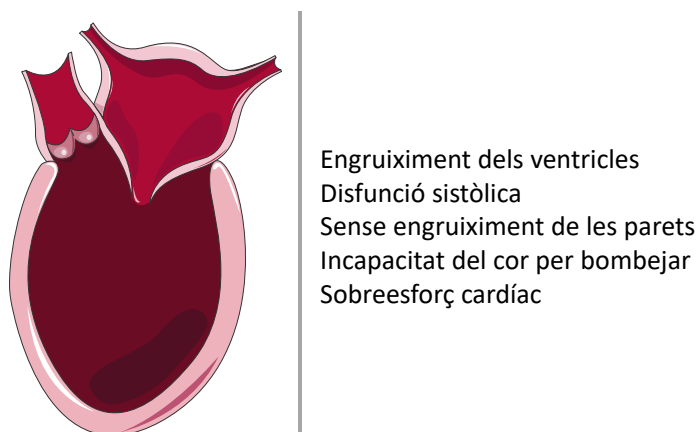
Hi ha un seguit de desordres congènits i arrítmies causades per mutacions en gens que regulen les proteïnes dels canals iònics, que gestionen el pas de ions de sodi i potassi a través de la membrana cel·lular. Aquestes mutacions causen disfuncions elèctriques del cor sense afectar-ne l'estructura. Entre aquests desordres hi ha el síndrome *Long-QT*, el síndrome Brugada, la taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica, el síndrome *Short-QT* i la fibril·lació ventricular idiopàtica (Maron, *et al.*, 2006).



### ***1.1.2.2 Miocardiopaties mixtes (genètiques i no genètiques)***

#### *1.1.2.2.1 Miocardiopatia dilatada*

La miocardiopatia dilatada (**Figura 3**) és una afectació cardíaca freqüent (1:2500), essent la tercera causa global d'insuficiència cardíaca. La miocardiopatia dilatada es produeix quan hi ha un engruiximent dels ventricles i una disfunció sistòlica sense engruiximent de les parets (Maron, *et al.*, 2006).



**Figura 3. Miocardiopatia dilatada. Fets fisiopatològics rellevants.**

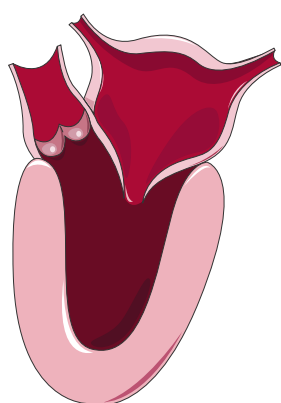
Normalment l'afectació comença pel ventricle esquerre. La debilitat dels ventricles fa que el cor no bombegi la sang de manera adequada, produint un sobreesforç cardíac. Si aquesta afectació perdura en el temps el cor perd la capacitat de bombejar la sang de manera efectiva i aquesta miocardiopatia pot acabar portant a una fallada cardíaca. Es tracta d'una malaltia irreversible i és una causa freqüent de transplantament cardíac. La miocardiopatia dilatada pot ser causada per infeccions d'origen víric,

bacterià, fúngic o parasitari, i sovint deriva en miocarditis. Hi ha altres causes com toxines, consum d'alcohol, quimioteràpia, metalls, desordres autoimmunes o neuromusculars, distròfies musculars, desordres mitocondrials, metabòlics, endocrins o nutricionals que poden també causar miocardiopatia dilatada.

Entre les causes de miocardiopatia dilatada hi ha el consum crònic excessiu d'alcohol (miocardiopatia alcohòlica), entitat que s'estudiarà en detall en aquesta tesi. Segons una revisió de Guzzo-Merello, *et al.* (2014), entre un 23 i 47% dels casos de miocardiopatia dilatada adquirida en països desenvolupats és causada pel consum crònic excessiu d'alcohol. Aquesta relació es dona de manera dosi-dependent començant per una disfunció diastòlica que porta a una disfunció sistòlica i a fallada cardíaca congestiva amb increment marcat de morbi-mortalitat. (Fernández-Solà, 2015).

#### *1.1.2.2.2 Miocardiopatia restrictiva*

La miocardiopatia restrictiva (**Figura 4**) es produeix quan els ventricles es tornen rígids però sense engruiximent de les parets cardíques (Maron, *et al.*, 2006). Com a conseqüència, els ventricles no es relaxen i no s'emplenen adequadament de sang. A mesura que avança la malaltia els ventricles no bombegen bé la sang i el múscul es debilita. Aquesta miocardiopatia pot acabar derivant en insuficiència cardíaca i afectació valvular secundària.



Rigidesa dels ventricles  
Sense engruiximent de les parets  
No relaxació dels ventricles  
Incapacitat del cor per bombejar  
Debilitament del múscul

Figura 4. Miocardiopatia restrictiva. Fets fisiopatològics rellevants.

### ***1.1.2.3 Miocardiopaties adquirides***

#### ***1.1.2.3.1 Miocarditis***

La miocarditis és un procés inflamatori del múscul cardíac (Maron, *et al.*, 2006) que pot està produïda per tant per toxines com per agents infecciosos (vírics, bacterians o parasitaris). Normalment es caracteritza per una infiltració de cèl·lules inflamatòries derivant en edema i necrosis focal dels miòcits. En alguns casos pot derivar en una reacció autoimmune causant dany al miocardi fins a derivar en miocardiopatia dilatada amb disfunció del ventricle esquerre.

#### ***1.1.2.3.2 Miocardiopatia de l'estrès ("Tako-Tsubo")***

La miocardiopatia de l'estrès es caracteritza per una disfunció del ventricle esquerre sense afectació arterioscleròtica de l'arteria coronària, produïda

per un estrès psicològic (Sharkey, *et al.*, 2005). Es va descriure per primer cop al Japó on es coneix com “Tako-Tsubo” (Maron, *et al.*, 2006). Normalment afecta a dones d’edat avançada i afecta la part distal del ventricle esquerre.

### 1.1.3 Miocardiopaties secundàries

Les miocardiopaties secundàries es defineixen com aquelles on el principal òrgan afectat no és el cor. Maron *et al.* (2006) fa una llista de les que es donen de manera més freqüent (**Taula 1**).

**Taula 1. Miocardiopaties secundàries (Maron *et al.* 2006)**

<b>Infiltratives</b>	Amiloidosis (primària, secundària, senil, familiar autosòmica dominant), malaltia de Gaucher, malaltia de Hurler, malaltia de Hunter.
<b>Dipòsit</b>	Hemocromatosis, malaltia per diòxid de gluogen (malaltia de Pompe), malaltia de Fabry, malaltia de Niemann-Pick.
<b>Tòxiques</b>	Drogues, metalls pesats, agents químics.
<b>Endomiocàrdiques</b>	Fibrosis endomiocàrdica, síndrome hipereosinofílic (Löeffler).
<b>Granulomatoses o inflamatòries</b>	Sarcoidosis.
<b>Endocrines</b>	Diabetis mellitus, hipertiroidisme, hipotiroidisme, hiperparatiroidisme, feocromocitoma, acromegalia.
<b>Cardiofacial</b>	Síndrome de Noonan, Lentiginosis.
<b>Neuromuscular/neurològica</b>	Ataxia de Friedreich, distròfia muscular de Duchenne-Becker, distròfia muscular de Emery-Dreifuss, distròfia miotònica, neurofibromatosis, esclerosi tuberosa.
<b>Dèficit nutricional</b>	Beri-beri, carnitina, selenio, pelagra, kwashiorkor.
<b>Autoimmunes/colagenosis</b>	Lupus eritematoso sistèmic, dermatomiositis, artritis reumatoide, esclerodermia, poliarteritis nodosa.
<b>Trastorns electrolítics</b>	Hipocalcèmia, hipofosfatèmia, hipomagnasèmia, hipokalièmia.
<b>Teràpia per al càncer</b>	Antraciclina, ciclofosfamida, radiació.

## **I.2 Hipertensió arterial**

La hipertensió arterial (HTA) és una de les principals causes i factors de risc d'insuficiència cardíaca crònica (Levy, *et al.*, 1996). Es tracta es una afectació dels vasos sanguinis i es defineix que hi ha hipertensió arterial quan la pressió sanguínia és almenys de 140 mm Hg a la sístole o 90 mm Hg a la diàstole (JNC, 1993, de la Sierra, *et al.*, 2008, Coll de Tuero, *et al.*, 2012).

### **I.2.1 Epidemiologia de la hipertensió**

A Catalunya la hipertensió arterial afecta a 1 de cada 4 adults. Tot i que en els últims anys ha augmentat l'ús de tractaments antihipertensius per tal de controlar la pressió arterial, encara hi ha més de la meitat dels pacients que, per desconeixement, no fan aquests controls (Llisterri, *et al.*, 2012, Banegas, *et al.*, 2015). A més, un terç dels pacients desconeix el seu status d'hipertensió i un 40% no s'estan tractant adequadament (Banegas, *et al.*, 2015). Com a resultat d'això, només 1 de cada 4 pacients aconsegueix tenir la pressió arterial controlada. En aquests sentit, s'ha de millorar l'estratègia per tal d'arribar a aquells pacients que no estan controlats de manera correcte a banda d'iniciar canvis en els estils de vida, sobretot en la població més adulta (Llisterri, *et al.*, 2012, Banegas, *et al.*, 2015).

Zhou *et al.* (2017) revisa les tendències de la pressió arterial a nivell mundial entre el 1975 i el 2015. Es determina una prevalença de pressió arterial alta

en un 24.1% dels homes i un 20.1% de les dones l'any 2015. S'observa que hi ha hagut un increment important d'aquesta patologia en els últims anys. Aquest increment es pot atribuir a l'envelliment de la població.

L'alta prevalença d'hipertensió arterial i la seva manca de control i seguiment és un gran repte a nivell de salut pública (Catalá-López, *et al.*, 2012). En aquest sentit s'ha d'arribar a consensos sobre el control de la hipertensió arterial enfocant-ho sobretot en aquells grups més desfavorits.

### 1.2.2 Fisiopatologia de la hipertensió

El cor és un dels majors òrgans afectats en pacients amb hipertensió. Prop d'un 20% dels pacients amb hipertensió moderada i un 80% dels pacients amb hipertensió greu desenvolupen canvis funcionals o estructurals en el cor, portant a disfunció diastòlica, hipertròfia ventricular esquerra o fallada cardíaca: el que es coneix com a miocardiopatia hipertensiva (Lip, *et al.*, 2000). Això implica un augment en la morbiditat i la mortalitat d'aquests pacients que poden desenvolupar arrítmies, fallada cardíaca congestiva o mort sobtada (Diamond i Phillips, 2005). Els mecanismes fisiopatològics implicats en la hipertensió (**Figura 5**) són multifactorials i additius (Hill i Olson, 2008).

L'augment de la massa ventricular en la hipertensió és deguda a diferents factors. Els gens implicats són els del sistema renina-angiotensia-

aldosterona, el gen receptor del pèptid natriurètic tipus A, proteïna lligada a miosina i el gen de la subunitat G-proteïns  $\beta$ -3 que afecta l'intercanvi de  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ . La hipertrofia del ventricle dret és deguda a una seqüència que ve de l'increment de l'estrès de la paret i pot comportar una hipertròfia cel·lular del miòcit. Altres factors afecten el senyal hipertròfic al cardiòcit, com són l'alliberament de calci intracel·lular, i d'altres estímuls hormonals com l'angiotensina II, adrenalina, endotelina, altres hormones i factors de creixement. Tot això deriva a una activació de la transcripció de gens que porten a la hipertrofia del miòcit (Hill i Olson, 2008).

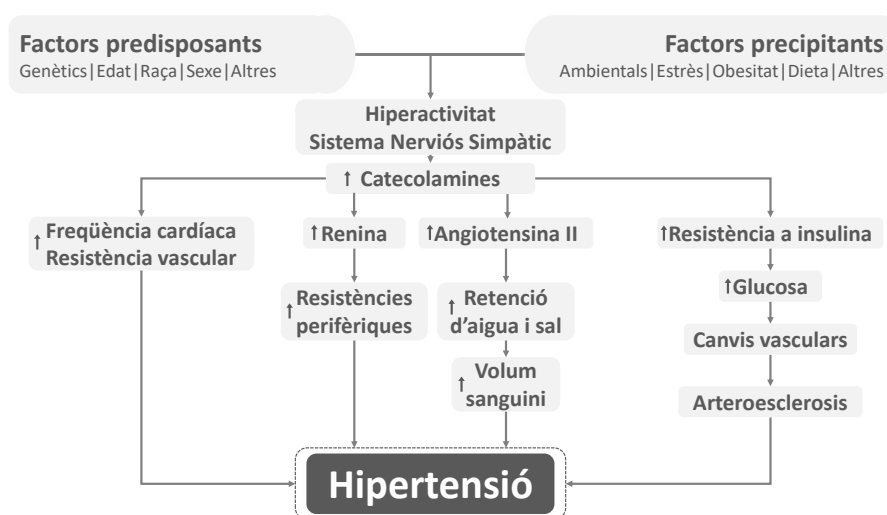


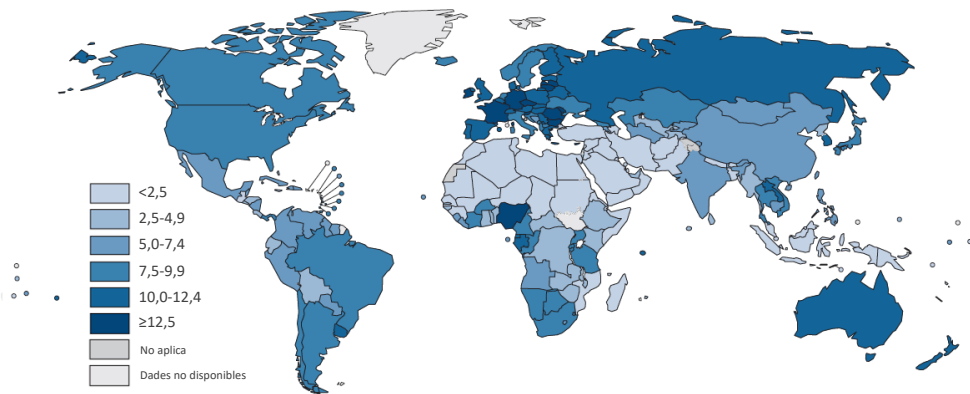
Figura 5. Fisiopatologia de la hipertensió arterial (Kaplan i Flynn, 2006)

### 1.3 Consum excessiu d'alcohol

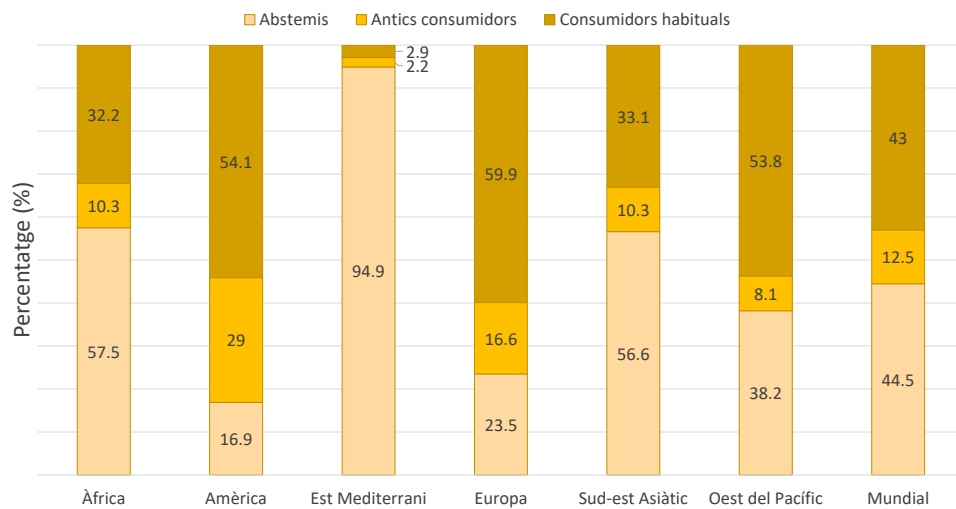
L'alcohol és una substància que ha estat present en la societat al llarg de la història (Fernández-Solà, 2015). La **Figura 6** mostra els paràmetres de consum d'alcohol i la seva distribució a nivell mundial (WHO, 2018).

Tot i que el seu consum ha esdevingut àmpliament acceptat socialment, els seus efectes negatius sobre l'organisme són importants, essent el fetge, l'aparell digestiu, el sistema neurològic i el sistema cardiovascular els principals òrgans afectats (Parry, *et al.*, 2011, Shield, *et al.*, 2014).

A. Consum per càpita de l'any 2016 en població de > 15 anys (litres d'alcohol pur)



B. Percentatge de consumidors habituals, antics consumidors i abstemis en població de més de 15 anys en 7 regions del món l'any 2016



**Figura 6. Distribució mundial del consum d'alcohol (WHO, 2018)**

Tot i que hi ha estudis que conclouen que un consum moderat de begudes alcohòliques (<40 g/dia en homes i <20 g/dia en dones) és beneficiós per l'organisme (Lee i Regan, 2002), un consum crònic i excessiu pot derivar en



miocardiopatia dilatada entre d'altres malalties cardiovasculars (Preedy, *et al.*, 2001, Spies, *et al.*, 2001, Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004, Zhang, *et al.*, 2010).

De fet, el consum d'alcohol a part de produir afectacions sobre el sistema cardiovascular, pot portar a l'aparició de certs tipus de càncer, cirrosi hepàtica i a la mort (Di Castelnuovo, *et al.*, 2006). És important remarcar que el benefici per a la salut que es conclou en alguns estudis és principalment degut als polifenols o d'altres antioxidants presents en aquestes begudes, i no a la presència d'alcohol (Chiva-Blanch, *et al.*, 2013). La **Figura 7** mostra un esquema dels principals efectes del consum d'alcohol sobre l'organisme.

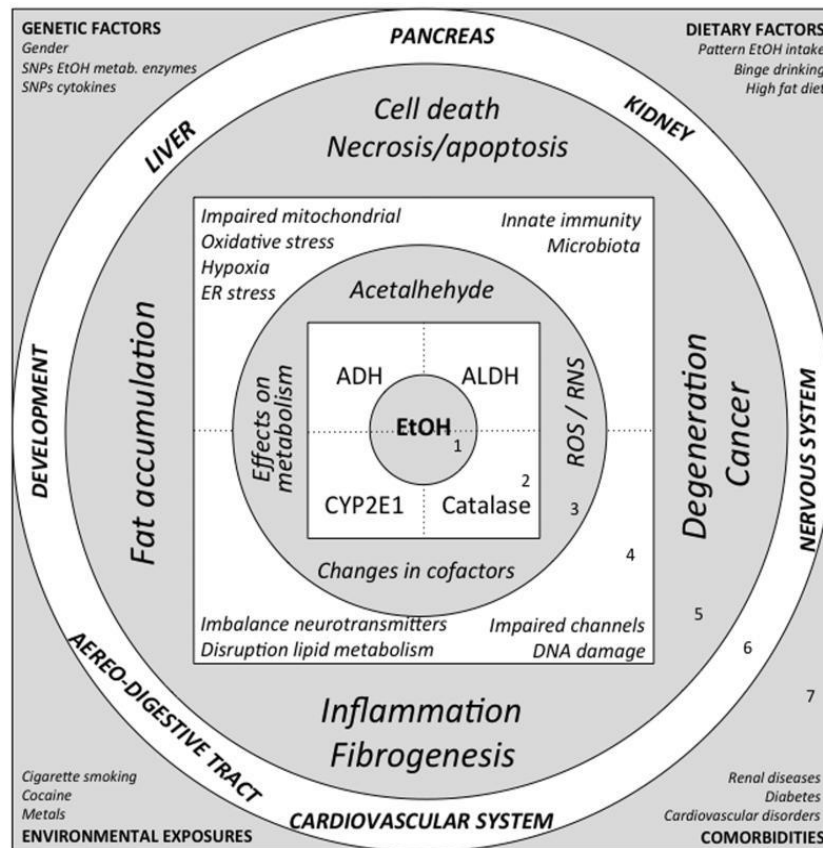


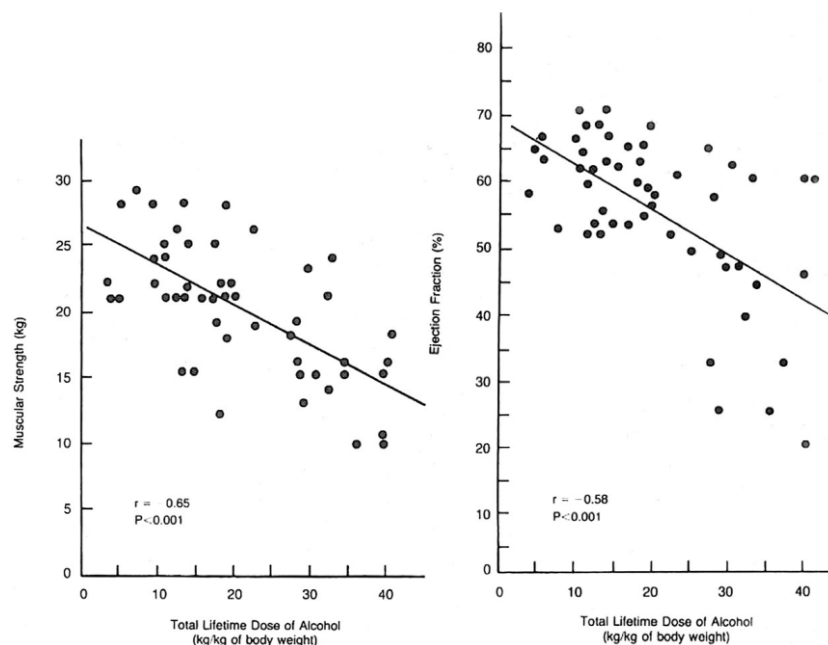
Figura 7. Esquema de l'afectació sistèmica produïda pel consum d'alcohol (Rusyn i Bataller, 2013)

El dany causat pel consum d'alcohol és dosi-dependent: el consum elevat i excessiu d'alcohol té majors efectes sobre els òrgans afectats que un consum baix o moderat (Rehm, *et al.*, 2003, Rehm, *et al.*, 2009, Shield, *et al.*, 2014). Segons la OMS un consum excessiu d'alcohol està considerat en 60 g/dia en homes i 40 g/dia en dones. Gairebé 1 de cada 3 d'individus amb un consum excessiu d'alcohol té alguna patologia cardíaca ja sigui miocardiopatia alcohòlica, hipertròfia cardíaca, arrítmies o disminució del volum sistòlic (Ren i Wold, 2008).

La miocardiopatia alcohòlica és una de les majors complicacions de l'alcoholisme crònic (Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004). Té una relació dosi-depenent del consum d'alcohol (**Figura 8**) i no es veu afectada per dèficits nutricionals o vitamínics que pugui tenir el pacient (Fernández-Solà, *et al.*, 1997, Fatjó, *et al.*, 2005, Fatjó, *et al.*, 2007). La dosi acumulada necessària de consum d'alcohol per patir miocardiopatia alcohòlica és de 7 kg per kg de pes corporal d'etanol en homes i 5 kg en dones (Urbano-Márquez, *et al.*, 1989).

La miocardiopatia alcohòlica es caracteritza per uns canvis estructurals i funcionals en el miocardi que resten subclínic fins que es desenvolupa la miocardiopatia (Urbano-Márquez, *et al.*, 1989). També s'ha observat que hi ha una relació directa entre una disfunció cardíaca i una disfunció muscular esquelètica en pacients amb consum crònic d'alcohol (Fernández-Solà, *et al.*, 1994). S'ha observat també que hi ha una relació entre el consum d'alcohol

i dilatació de ventricle esquerre com a fase inicial d'una miocardiopatia dilatada (Rodrigues, *et al.*, 2018).



**Figura 8. Correlació entre la dosi acumulada d'alcohol i la força muscular i la fracció d'ejecció ventricular (Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004)**

#### **1.4 Fisiopatologia de la lesió miocàrdíaca**

El cor és un òrgan plàstic que presenta una capacitat adaptativa a estímuls fisiològics o patològics, com podria ser la hipertensió arterial, el consum excessiu d'alcohol, l'efecte de certs tòxics o la isquèmia. Els mecanismes adaptatius del cor, que permeten que aquest s'adapti a les noves situacions, són complexes i de diferent etiologia (Hill i Olson, 2008), tot i que alguns d'aquests mecanismes són comuns en diferents patologies.

Una de les principals respostes a un estímul crònic és la hipertròfia sense increment del nombre de cardiòcits (Buja i Vela, 2008, Hill i Olson, 2008).

Depenent de quin sigui l'origen de l'estímul, el cor pateix una adaptació o una altra. En el cas que l'estímul no es mantingui en el temps, la resposta adaptativa del cor pot revertir-se, mentre que si l'estímul segueix, la resposta adaptativa que era una hipertròfia acaba portant a una dilatació que pot acabar amb insuficiència cardíaca i l'aparició d'arrítmies.

L'acció reguladora de diferents agents sobre diversos punts del cicle cel·lular del teixit cardíac és el que produeix aquesta resposta del cor. Els agents més importants en el desenvolupament de la hipertròfia són les ciclines, les kinases, el Myc i l'E2F (Ahuja, et al., 2007).

La lesió cardíaca produïda pel consum d'alcohol o per la hipertensió arterial tenen mecanismes comuns com l'apoptosi, la fibrosi o la necrosi (Planavila i Fernández-Solà, 2015). Els mecanismes fisiopatològics de l'efecte tòxic de l'alcohol sobre el múscul estriat esquelètic i cardíac són multifactorials (Preedy, et al., 1996). Estudis previs han analitzat alguns d'aquests mecanismes (Fernández-Solà, et al., 1997).

L'apoptosi és un mecanisme de mort cel·lular programada, es tracta d'un procés ben regulat. En un estudi per valorar l'apoptosi en miocardi de donants es va observar que l'apoptosi es troba incrementada pacients amb hipertensió arterial i en pacients amb consum excessiu d'alcohol, i els donants alcohòlics que ja tenien dany cardíac presentaven un increment superior (Fernández-Solà, et al., 2006). Un altre dels mecanismes estudiats és l'efecte sobre els canals de Calci tipus-L. Es va demostrar que en els cors

dels donants alcohòlics sense miocardiopatia hi ha una sobre-expressió dels canals de Calci tipus-L que els quals permeten l'entrada de  $Ca^{2+}$  a dins el miòcit (Fatjó, *et al.*, 2007).

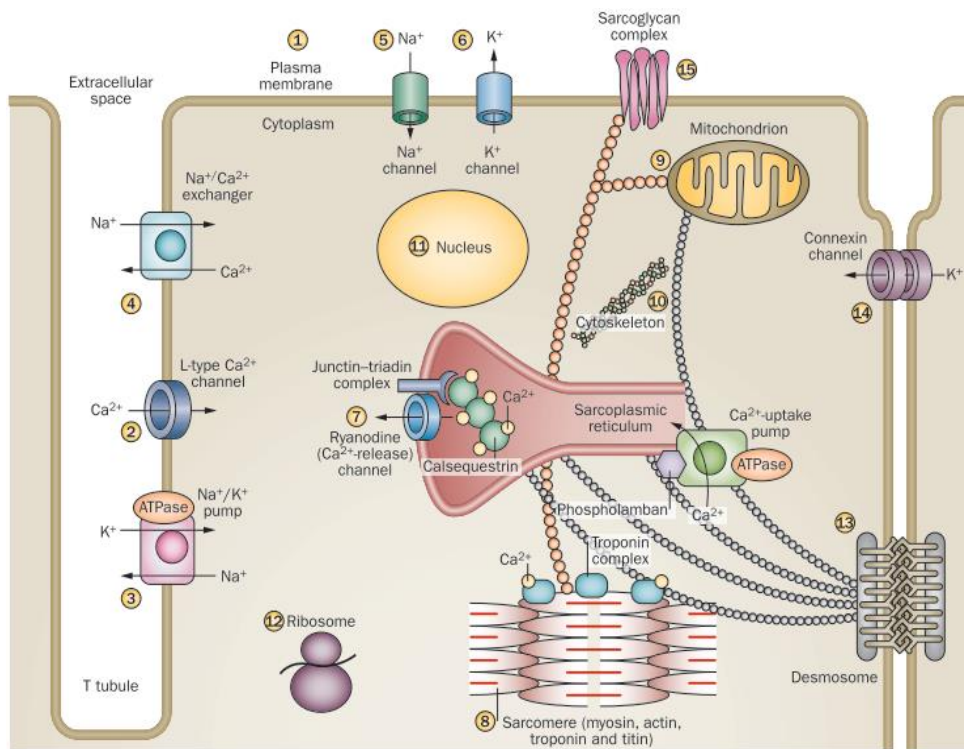
El consum crònic excessiu d'alcohol pot produir un ampli ventall d'efectes sobre el miocardi i sobre altres òrgans i sistemes (Fernández-Solà, 2015), aquests es detallen a la **Taula 2**.

**Taula 2. Efectes nocius del consum crònic excessiu d'alcohol sobre el miocardi (Fernández-Solà 2015)**

<b>Efectes aguts</b>	<b>Efectes crònics sobre el cervell</b>
Depressió transitòria de la contractilitat cardíaca	Infart isquèmic
Trastorn del ritme cardíac ( <i>holiday heart syndrome</i> )	Infart hemorràgic
Hipertensió arterial	Hemorràgia subdural
Infart cerebral isquèmic transitori	Mortalitat relacionada amb infart
Mort sobtada	
	<b>Efectes crònics sobre el Sistema vascular</b>
<b>Efectes crònics sobre el cor</b>	Aterosclerosi sistèmica
Disfunció ventricular (sistòlica i diastòlica)	Hipertensió arterial
Disfunció atrial	Malaltia arterial perifèrica
Arrítmies cròniques	Canvis en el perfil lipídic (colesterol LDL i triglicèrids)
Miocardiopatia alcohòlica (miocardiopatia subclínica, fallada cardíaca i miocardiopatia dilatada)	Diabetis mellitus
Malaltia coronària del cor (angina i infart de miocardi)	Canvi en els marcadors inflamatoris de l'endoteli
Mortalitat cardiovascular	Sinèrgia amb altres factors de risc vasculars (tabac i cocaïna)

L'alcohol té diferents punts d'acció sobre el cor, ja sigui de manera aguda o crònica (Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004, Fernández-Solà, 2015). Els efectes que produeix són una alteració de l'estructura miocardiàca amb una disminució de la contractilitat ventricular i arrítmies supraventriculars i ventriculars, fins a arribar a una insuficiència cardíaca, incrementant així el risc de mortalitat. La miocardiopatia alcohòlica crònica és produïda per

l'efecte sobre el miocardi d'un consum crònic excessiu d'alcohol durant llargs períodes de temps (>15 anys). L'alcohol pot produir lesions a diferents estructures cel·lulars que poden ser sinèrgiques augmentant així el dany final (**Figura 9**): fosfolípids, canals i transportadors de membrana, proteïnes contràctils sarcomèriques i estructurals del citoesquelet, mitocondris, ribosomes, reticle sarcoplasmàtic, material genètic nuclear, desmosomes i unions intercel·lulars.



(1) Membrana plasmàtica: composició i permeabilitat, senyalització i activació d'apoptosi; (2) Activitat del canal  $\text{Ca}^{2+}$  tipus-L; (3) Activitat del canal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa; (4) Activitat de l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; (5) Corrents del canal  $\text{Na}^+$ ; (6) Corrents del canal  $\text{K}^+$ ; (7) Activitat del canal rianodina; (8) Sensitivitat sarcomèrica a  $\text{Ca}^{2+}$ , acoblament excitació-contracció, estructura miofibril·lar i expressió proteica (9) funció mitocondrial, incloent activitat del complex respiratori; (10) estructura del citoesquelet; (11) regulació nuclear de la transcripció; (12) síntesi proteica ribosomal; (13) contactes desmosòmics; (14) comunicació de canal connexina; (15) interaccions del complex sarcoglíca.

**Figura 9. Diferents efectes de l'etanol en l'estructura i els òrgans miocardiàcs (Modificat de Fernández-Solà (2015))**

El dany crònic progressiu causat pel consum d'alcohol produeix una disminució de la síntesi proteica (actina, miosina, titina), disminueix l'homeòstasi energètica mitocondrial, altera la transmissió de senyals intracel·lulars i activa els mecanismes d'apoptosi, derivant així en la mort cel·lular (Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004, Fernández-Solà, 2015). Aquesta disminució de miocardiòcits acaba derivant en hipertròfia compensatòria de la resta de cèl·lules cardíques i fibrosi subendocárdica i intersticial, essent menys eficient (Urbano-Márquez, et al., 1995, Guzzo-Merello, et al., 2015).

El cor té diferents mecanismes defensius contra l'efecte tòxic de l'alcohol a més de ser capaç d'activar mecanismes compensatoris, tant en fase aguda com crònica (Fernández-Solà, 2015). El conjunt de mecanismes compensatoris és el que s'anomena remodelat, i és el que ha d'evitar un dany major del miocardi. El cor té un paper secretor, com a òrgan autocrí i paracrí amb la comunicació entre les diverses cèl·lules, per tal d'obtenir una resposta neuro-humoral protectora contra l'efecte tòxic de l'alcohol (Planavila, et al., 2017, Wu, et al., 2018). Es produeix una activació de mecanismes compensatoris neuro-hormonals com el sistema nerviós simpàtic, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, a més de l'alliberació de pèptids natriürètics i citocines, de forma aguda. En una resposta més mantinguda, es donen diversos mecanismes per tal de compensar l'efecte de l'alcohol: activació de factors antioxidants (SOD), antiapoptòtics (BCL2), sobre-regulació dels receptors de membrana, hipertròfia miocardiaca i

activació de mecanismes de regeneració cel·lular. Aquests mecanismes ajuden en un primer moment a mantenir la funcionalitat cardíaca, tot i que si el dany segueix i s'agreuja s'acaba produint un dany funcional i estructural irreversible fins a una miocardiopatia alcohòlica (Urbano-Márquez, *et al.*, 1995, Urbano-Márquez i Fernández-Solà, 2004, Fernández-Solà, 2015, Guzzo-Merello, *et al.*, 2015). Durant la fase subclínica de la malaltia es pot detectar algun d'aquests fets com la disfunció diastòlica sense que el malalt presenti símptomes. Posteriorment ja en la fase clínica poden anar apareixent diferents similars als que apareixen en altres miocardiopaties com la dilatada idiopàtica o la hipertensiva: dispnea d'esforç, ortopnea, edemes i episodis d'insuficiència cardíaca congestiva. El pronòstic final acaba depenent del grau de consum d'alcohol que tingui el malalt. En pacients que han deixat per complet el consum d'alcohol s'han observat millores destacables fins a la normalització de la funció ventricular, mentre que pacients que segueixen consumint presenten un deteriorament més ràpid d'aquesta funció.

Per tal de disminuir el dany miocardiàc produït per l'alcohol s'han plantejat diverses estratègies (**Taula 3**). Des del punt de vista de la regeneració miocardiàca, existeix un grup de molècules secretades pel cor (cardiomioquines) o per altres òrgans (cardioquines) que intenten controlar aquesta resposta (Planavila, *et al.*, 2017, Wu, *et al.*, 2018).



**Taula 3. Mecanismes de producció de dany miocardiàc per alcohol i els seus possibles efectors terapèutics**

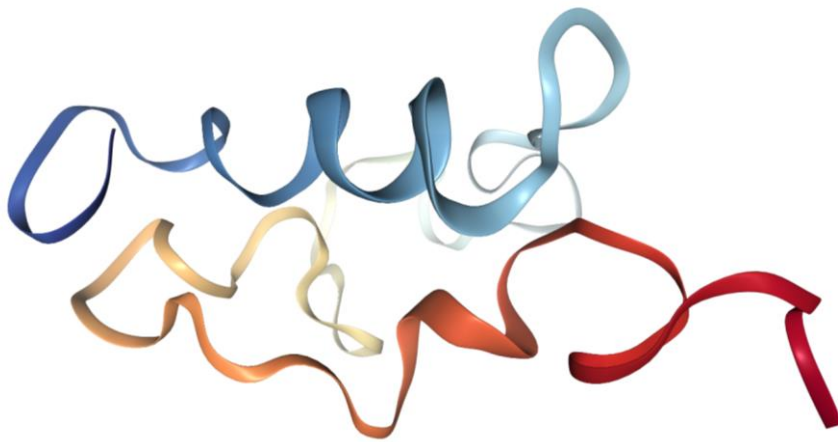
Mecanismes	Efectors
Interferència amb senyals de transducció calci-dependents	MAPK, TGF- $\beta$ , PKC, PPAR $\gamma$ , MMPs, NF- $\kappa$ $\beta$ , PAI-1
Disminució dels mecanismes d'acoblament excitació-contracció	Fluxos Intracel·lulars de [Ca] <sup>2+</sup> Canals tipus-L Ca <sup>2+</sup>
Inducció de dany oxidatiu	ROS, SOD, acetaldehid
Efecte proinflamatori	IL-2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ $\beta$
Inducció d'apoptosi	FAS, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Bax-Bcl-2, caspases
Inducció de fibrosi	TLR-4, TGF- $\beta$
Formació d'adductes proteics	Adductes proteïna-etanol Adductes malondialdehid-ADN
Disrupció de la síntesi proteica	Disminució de la síntesi de proteïnes ribosomals, actina, miosina, troponina, titina
Increment de dipòsit de glucogen	Glucogen sintase kinasa-3 $\beta$ , PARP
Activació del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	Renina, angiotensina, aldosterona, p38 MAPK/Smad
Interferència en factors de creixement	Miostatina, grelina, leptina, IGF-1
Interferència en cardiomiocines reguladores	FGF21, Metrnl
Disminució de la regeneració miocardiàca	Miostatina, IGF-1
Empitjorament del recanvi de la matriu extracel·lular	Estructura citoesquelètica, canals de conexina, desmosomes
Desequilibri entre lesions cardíques / mecanismes de reparació	Apoptosi i necrosi cel·lular, increment de fibrosi miocardiàca, disminució de la regeneració dels miocardiòcits

## 1.5 Factors de creixement

El cor està format per miocardiòcits principalment, a més de fibroblats, cèl·lules de múscul llis, cèl·lules endotelials i cèl·lules relacionades amb el sistema immune (Planavila, *et al.*, 2017). Totes aquestes cèl·lules interaccionen entre si mitjançant cardiomiocines. Aquesta comunicació produeix els canvis moleculars que intervenen en el remodelat cardíac. Alguns autors han descrit l'efecte potencial que poden tenir certs factors de creixement, com l' *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) i la miostatina, sobre la regulació en el desenvolupament del dany cardíac produït.

### I.5.1 Insulin-like Growth Factor-1

L'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) és una cadena simple de polipèptids amb una estructura similar a la de la proinsulina (**Figura 10**). L'IGF-1 té efectes a curt termini sobre la proliferació i la diferenciació de diferents tipus cel·lulars (**Figura 11**).



**Figura 10.** Estructura tridimensional de la mol·lècula l'*Insuline-like Growth Factor-1* (Rose, *et al.*, 2018)

La seva activitat mitogènica està mediada per la seva unió al receptor IGF tipus 1 que es troba a la superfície cel·lular (Leroith, *et al.*, 1995, Ren, *et al.*, 1999). Els efectes directes del receptor IGF-1 sobre la cèl·lula són la síntesis de DNA, la modulació dels gens que participen en el cicle cel·lular i l'entrada de la cèl·lula a la fase S del cicle cel·lular. Aquests efectes ajuden a la proliferació de la cèl·lula i incrementen la síntesi de proteïnes que acaba produint hipertròfia o, en el cas que hi hagi un dany miocardiàc, protegint el teixit. A més, té un efecte antiapoptòtic degut a una inhibició de la inducció

de BAX, l'activació de la caspasa i la fragmentació del DNA (Jones i Clemmons, 1995, Sell, *et al.*, 1995, Ren, *et al.*, 1999).

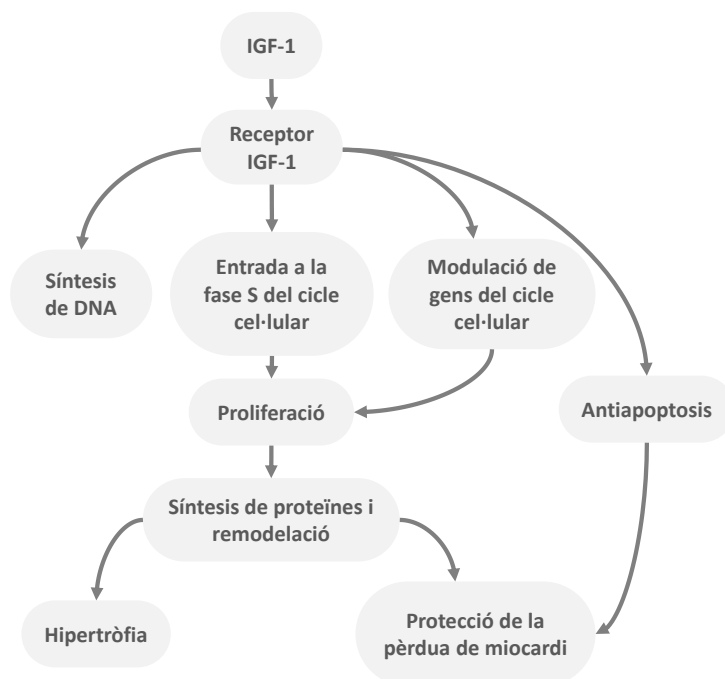


Figura 11. Esquema dels efectes de l'*insuline-like growth factor-1* (IGF-1) sobre les cèl·lules

Alguns estudis han avaluat el paper de l'IGF-1 i de la GH (hormona de creixement) en la funció cardíaca i en el dany dels miòcits després d'un infart de miocardi. Tant IGF-1 com GH han demostrat tenir un efecte terapèutic sobre la insuficiència cardíaca. La GH es lliga al receptor IGF-1 a través de l'IGF-1 promovent el creixement tissular i la diferenciació (Delafontaine, 1995, Dean, *et al.*, 2003). Un estudi experimental sobre l'IGF-1 va observar que la sobre-expressió d'aquesta hormona de creixement té un efecte beneficiós sobre la disfunció miocardiàca per consum excessiu d'alcohol (Zhang, *et al.*, 2010).

No hi ha estudis clínics previs que hagin estudiat quin és l'efecte directe de l'alcohol sobre l'IGF-1 al miocardi. En aquest sentit, un dels paràmetres més rellevants en la fisiopatologia dels efectes sobre el cor de l'IGF-1 és la seva expressió miocardiàca (Tong, *et al.*, 2012, Yi, *et al.*, 2013).

### 1.5.2 Miostatina

La miostatina (**Figura 12**), que es coneix també com a *growth differentiation factor-8* (GF-1 $\beta$ ), és un inhibidor del creixement del múscul esquelètic i cardíac que en concentracions elevades limita la multiplicació cel·lular del teixit muscular i, per tant, és per això que durant les fases de desenvolupament es troba inhibida (Joulia-Ekaza i Cabello, 2006).

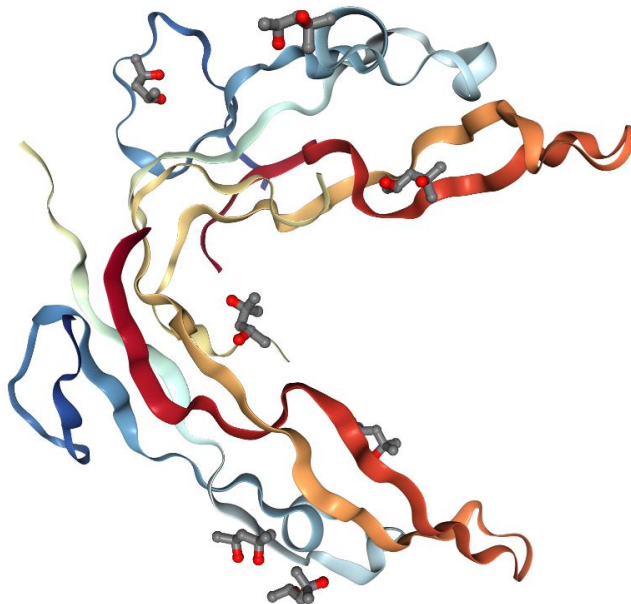


Figura 12. Estructura tridimensional de la mol·lècula de miostatina (Rose, *et al.*, 2018)

La miostatina controla la progressió del cicle cel·lular i inhibeix la proliferació i la diferenciació del mioblast esquelètic. Un augment en l'activitat de la miostatina protegeix a la cèl·lula de l'apoptosi. Quan es troba disminuïda produeix un augment en la massa esquelètica amb hipertròfia i hiperplàsia dels miòcits, incrementant-ne la proliferació (Joulia-Ekaza i Cabello, 2006, McKoy, *et al.*, 2007). La miostatina és un factor de creixement que inhibeix la proliferació del múscul i els miòcits. Per això, durant el desenvolupament tissular es troba disminuïda.

Estudis anteriors realitzats en miocardi d'individus sans, alcohòlics cardíopates i no cardíopates i pacients amb altres miocardiopaties han demostrat un increment en l'expressió de miostatina en els pacients amb miocardiopatia (tant alcohòlica com no alcohòlica) respecte els sans (Lang, *et al.*, 2004, Fernández-Solà, *et al.*, 2011).

## **1.6 Influència de la hipertensió arterial i el consum excessiu d'alcohol sobre el dany cardíac**

La hipertensió arterial i el consum crònic excessiu d'alcohol són factors de risc independents pel que fa al desenvolupament de dany cardíac. Aquests factors poden incrementar també el risc de patir un infart de miocardi. S'ha vist que, en la patogènia de la miocardioaptia alcohòlica i hipertensiva, hi ha mecanismes de lesió comuns. No es preveu que les patologies cardíques causades per aquests de factors de risc disminueixin en els propers anys, ja

que és difícil controlar-ne les causes primàries. El consum excessiu d'alcohol sembla que no es reduirà i la prevalença d'hipertensió arterial seguirà essent elevada. Per aquest motiu és important conèixer bé els factors i els mecanismes que causen el dany cardíac per tal de trobar estratègies per controlar-lo.



Capítol II

**Hipotesi i Objectius**

---





## Hipòtesi de treball

En situacions de dany miocardiàc difús, el teixit miocardiàc intenta una reacció de remodelat que comporta desenvolupament d'hipertròfia i proliferació que està regulada per factors hormonals i de creixement tissular, que poden modular la recuperació del teixit davant la lesió. La nostra hipòtesi és que l'expressió d'IFG-1 en els miòcits es veu afectada de manera negativa en pacients amb hipertensió arterial, i també en pacients amb un consum crònic excessiu d'alcohol. Per altra banda, pel que fa a la miostatina en el cas d'hipertensió i en pacients amb consum crònic d'alcohol tenim la hipòtesi que la seva activitat es troba incrementada.

En la present tesi s'estudien mostres de miocardis humans procedents de donants d'òrgans. Es classifiquen els donants en diferents grups atenent al consum d'alcohol, la presència d'hipertensió arterial i la presència de miocardiopatia.

## Objectiu general

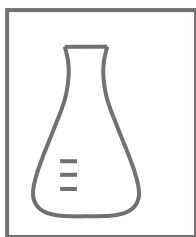
L'objectiu principal és conèixer millor els mecanismes de lesió i remodelat miocardiàc en les situacions de hipertensió arterial i en el consum crònic d'alcohol, ambdós molt presents a la nostra societat.

La finalitat última seria la prevenció del dany miocardiàc davant l'exposició a aquests factors de risc i a la vegada facilitar la recuperació miocardiàca una vegada establert el dany tissular.

Per aquest motiu s'estudiaran els efectes de la hipertensió arterial i el consum crònic d'alcohol sobre l'expressió miocardiàca d'IGF-1 i miostatina.

## Objectius específics

1. Valorar l'efecte de la presència d'hipertensió arterial sobre l'expressió miocardiàca d'IGF-1.
2. Valorar l'efecte de la presència d'hipertensió arterial sobre l'expressió miocardiàca de miostatina.
3. Valorar l'efecte del consum excessiu d'alcohol sobre l'expressió miocardiàca d'IGF-1.
4. Analitzar la possible correlació entre el consum d'alcohol i l'expressió miocardiàca d'IGF-1.
5. Valorar l'efecte de la presència de miocardiopatia tant en donants amb hipertensió arterial com en consum crònic d'alcohol.



## Capítol III

# Metodologia

---



### III.1 Selecció de donants i controls

Durant un període de 10 anys 2000-2010, a la unitat de trasplantaments de l'Hospital Clínic es va valorar una sèrie consecutiva de donants en mort cerebral deguda a traumatisme o a causes cerebrovasculars per a possible trasplantament. Tots els casos es van admetre a la unitat de cures intensives i durant l'hospitalització es van mantenir els paràmetres hemodinàmics i de ventilació ( $\text{PaO}_2 > 60$  mmHg, pressió sistòlica  $> 100$  mmHg, i el pH en el rang normal).

D'aquests donants menors de 70 anys es van separar 66 cors que no eren adequats per trasplantar i que es van classificar segons el consum crònic d'alcohol, presència de miocardiopatia i presència d'hipertensió arterial. Segons aquests paràmetres es van definir 6 grups de pacients: 1) donants sans (sense consum d'alcohol ni cardiopatia), 2) donants amb hipertensió sense miocardiopatia, 3) donants amb miocardiopatia hipertensiva, 4) donants amb altres causes de miocardiopatia (isquèmica, valvular i idiopàtica), 5) donants amb consum crònic d'alcohol sense miocardiopatia i 6) donants amb consum crònic d'alcohol amb miocardiopatia.

Tots els donants eren caucàsics d'ascendència espanyola, vivien a Catalunya i cap d'ells era indigent. Hi havia donants d'ambdós sexes. El protocol de l'estudi va ser acceptat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Clínic de Barcelona, incloent el consentiment informat dels familiars dels donants per utilitzar els miocardis en aquest protocol (**Annex 1**).

La informació sobre el consum d'alcohol es va obtenir retrospectivament a través dels familiars mitjançant un qüestionari estandarditzat (de Vries, *et al.*, 1999). La hipertensió es va definir en valors de pressió sistòlica  $\geq 140$  mmHg o de pressió diastòlica  $\geq 90$  mmHg basant-se en el fet que els tractaments per reduir la pressió sanguínia són beneficiosos en pacients amb aquests valors de pressió (Mancia, *et al.*, 2013). Es va definir un consum crònic excessiu d'alcohol en  $\geq 60$  g/dia durant més de 10 anys. Es van avaluar signes passats de fallada cardíaca a través dels informes mèdics i de la informació dels familiars dels donants, a més es va determinar la classe funcional de la New York Heart Association (NYHA) segons l'activitat en l'escala de Goldman (Goldman, *et al.*, 1981). Es va mesurar l'índex cardioràdic mitjançant radiografies de tòrax (Normal  $< 0,48$ ) i es van fer electrocardiografies convencionals en tots els casos. En els casos amb un índex cardioràdic elevat ( $>0,48$ ) es va fer electrografies bidimensionals (Hewlet Packard Sonos 2500; Hewlet Packard, Andover, MA). Els diàmetres telediastòlics i telesistòlics, la fracció d'escurçament, la massa del ventricle esquerre (LV) i la fracció d'ejecció (EF) es van mesurar segons els estàndards de la American Society of Echocardiography (Gottdiener, *et al.*, 2004). La miocardiopatia es va definir amb a la presència de la fracció d'ejecció del ventricle esquerre  $< 50\%$  i engrossiment del ventricle esquerre, a més de la presència de dany histològic miocardiàc (Apartat III.5).

### III.2 Presa de mostres de miocardi

Es va prendre quirúrgicament una mostra de 3 cm de teixit miocardiàc procedent de l'apex del ventricle esquerre. Les mostres de miocardi es van conservar en congelació a -80°C. La tècnica d'immunohistoquímica requeria el tall de les mostres a 10 µm mitjançant el criotom i fixació en portaobjectes. Els talls es van conservar en congelació (-80°C) fins al moment de la seva utilització.

### III.3 Tècnica immunohistoquímica per a IGF-1

Per valorar l'expressió miocardiàca IGF-1 es va utilitzar una tècnica immunohistoquímica. Es van fixar els talls amb acetona durant 10 minuts i després es van escalfar en estufa a 95 °C durant 30 minuts amb un tampó citrat (2.94 g Tri-sodium citrat + 1000 ml H<sub>2</sub>O + 0.5 ml Tween 20 portat a pH 6 amb HCl 1N) i es va deixar refredar 20 minuts a temperatura ambient. Es van rentar els talls amb PBS i després es va fer el blocatge amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a l'1% durant 15 minuts i es van tornar a rentar amb PBS. La detecció d'IGF-1 es va fer utilitzant un kit comercial d'un anticòs policlonal de conill (IGF1 antibody, ab9572, Abcam). L'anticòs té un immunogen recombinant hIGF1 (*human insulin-like growth factor-1*). La dilució utilitzada de l'anticòs primari IGF-1 va ser de 4 µg/ml en una solució de *blocking serum* 1.5 % en PBS i es va incubar durant tota la nit a 4 °C. Es va fer un control negatiu de cada mostra sense afegir-hi l'anticòs primari. La lectura es va fer mitjançant el kit comercial d'un

anticòs secundari compatible (rabbit ABC Staining System, sc-2018, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Es va realitzar un últim rentat amb H<sub>2</sub>O, es van tenyir els talls amb hematoxilina de Gill 2 durant 10 minuts i es van rentar amb aigua de l'aixeta durant 5 minuts. Finalment es va afegir Aquatex<sup>®</sup> (Darmstadt, Germany) a les preparacions per col·locar-hi el cobreobjectes.

#### **III.4 Tècnica immunohistoquímica per a miostatina**

Per l'avaluació de l'expressió miostatina en el miocardi es va utilitzar també una tècnica immunohistoquímica emprant un kit comercial d'un anticòs monoclonal (GDF8 -ab996- datasheer, Abcam, USA) amb especificitat humana a la miostatina. Aquest anticòs té un seqüència d'un immunogen comú per la miostatina i el seu precursor AA 348-364 (NMLYFNGKEQIIIGKI) que detecta totes les formes de miostatina (precursors, dímers i monòmers). La dilució es va fer a 1/1000 en un tampó citrat a pH 6. La lectura es va fer mitjançant l'anticòs secundari compatible lligat a peroxidassa (ab6722, Abcam). L'anticòs té reactivitat nuclear i citoplasmàtica.

#### **III.5 Valoració microscòpica**

Es va fer un estudi histològic previ amb hematoxilina/eosina i tricròmic de Gomori per definir si un donant estava afectat per miocardiopatia. Es va analitzar primerament per microscòpia òptica la presència d'hipertròfia



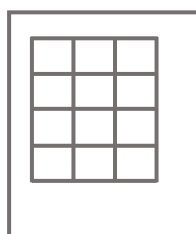
cel·lular i nuclear, de fibrosi interstrial i necrosi (Fernández-Solà, *et al.*, 1994). Es va graduar semiquantitativament com a: lleu, moderat o intens (0/+/++/+++).

L'expressió immunohistoquímica d'IGF-1 i miostatina es va avaluar amb microscòpia òptica a 200 augments mitjançant un estudi semiquantitatiu, comptant el tant per cent de cèl·lules positives respecte el total de cèl·lules valorades. Es va mesurar la positivitat de IGF-1 tant a nivell nuclear com citoplasmàtic. De cada mostra es valoren 6 camps, comptant entre 200 i 600 cèl·lules per camp (mínim de 1200 cèl·lules per mostra). Es van comparar els resultats dels pacients control amb els alcohòlics amb i sense miocardiopatia i també amb els pacients hipertensos i amb altres causes de miocardiopatia.

### **III.6 Anàlisi estadístic**

Els resultats del comptatge s'han analitzat amb el programa estadístic SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL). En primer lloc es van calcular estadístics descriptius i es va fer un test de normalitat (Kolmogorov-Smirnov). Tot i que els diferents grups seguien una distribució normal, com que la mida de la mostra era petita, es va emprar un test no paramètric (Mann Whitney) per valorar si hi havia diferències significatives entre els diferents grups. Es va utilitzar un nivell de significació de 0.05.





Capítol IV

**Resultats**

---



**IV.1 Article 1: Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption**

Francesc Borrissier-Pairó, Emilia Antúnez, Ester Tobías i Joaquim Fernández-Solà (2013). *Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption*. Regenerative Medicine Research 1(1):3.

DOI: <https://doi.org/10.1186/2050-490X-1-3>



RESEARCH

Open Access

# Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption

Francesc Borrisser-Pairó, Emilia Antúnez, Ester Tobías and Joaquim Fernández-Solà\*

## Abstract

**Background:** Alcoholic cardiomyopathy (CMP) is one of the major complications of chronic excessive alcohol consumption. The pathogenic mechanisms implicated are diverse, inducing functional and structural changes in the myocardium. Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) plays an important role in modulating the cell cycle, and helps the differentiation and proliferation of cardiac tissue inhibiting apoptosis. Experimental studies have suggested the role of IGF-1 in alcohol-induced cardiac damage. The aim of the present study was to determine the effect of chronic alcohol consumption on IGF-1 myocardial expression and to compare this expression in cases of hypertension and other cardiac diseases.

**Methods:** We studied heart samples from human organ donors: 10 healthy donors, 16 with hypertension, 23 with chronic alcohol consumption and 7 with other causes of cardiac disease. IGF-1 myocardial expression was evaluated with a specific immunohistochemistry assay using a semi-quantitative method.

**Results:** A significant decrease in IGF-1 myocardial expression was observed comparing all the cases included with control donors. This decrease in IGF-1 myocardial expression was significantly lower in the group of donors with chronic alcohol consumption compared to controls. On group evaluation according to the presence of CMP, donors with chronic alcohol consumption without CMP presented significantly lower IGF-1 expression than controls, whereas donors with chronic alcohol consumption with CMP showed a downward trend without achieving significance.

**Conclusions:** Chronic alcohol consumption significantly reduces IGF-1 myocardial expression. This decrease induced by alcohol is partially compensated in the presence of structural myocardial damage.

**Keywords:** Alcohol, Myocardium, IGF-1

## Background

Although there is evidence that moderate alcohol consumption has some beneficial effects in health [1], chronic and excessive alcohol intake can lead to the development of dilated cardiomyopathy (CMP) and other cardiovascular diseases [2-5]. Almost 1 in 3 alcoholic misusers develop heart disease, whether alcoholic CMP, cardiac hypertrophy, arrhythmias or reduced myocardial contractility [6].

Alcoholic CMP is one of the major complications of chronic alcoholism [5], developing in a dose-dependent

manner, independently of vitamin or nutritional deficits [7-9]. The cumulative lifetime dose of alcohol needed to develop alcoholic CMP has been assessed as 7 kg per kg of body weight of ethanol in men and 5 kg in women [10]. Alcoholic CMP is characterized by progressive structural and functional changes in the myocardium that remain subclinical for years until the appearance of heart failure or arrhythmia [10]. There is also a direct relationship between cardiac dysfunction and skeletal myopathy in patients with alcoholic CMP [11].

The physiopathological mechanisms implicated in alcohol-induced toxic damage to striated skeletal and cardiac muscle are multifactorial and are probably additive [12,13], being apoptosis, oxidative damage and contractile protein disruption the most relevant [3,12]. In previous studies in chronic alcoholic donors, we

\* Correspondence: [jfernand@clinic.ub.es](mailto:jfernand@clinic.ub.es)  
Alcohol Research Unit. Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

observed an increase in myocardial apoptosis to a similar degree as that caused by hypertension. This effect was more prominent in alcoholic donors with already developed heart damage [14]. In another study we observed that hearts from donors without alcoholic CMP presented over-expression of L-type calcium channels, a fact that increases  $Ca^{2+}$  entry into the cells and induces myocyte damage [9].

Recently, some authors described the potential effect that diverse myocyte growth factors such as myostatin and IGF-1 may exert in regulating the development of alcohol-induced heart damage. Myostatin is a growth factor that, when up-regulated, inhibits the proliferation of muscle and cardiac myocytes, for this reason it is down-regulated during tissue development [15]. We have reported an increase in myostatin myocardium activity in subjects with CMP either of alcoholic or non alcoholic origin [16].

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) is a simple string of polypeptides with a structure similar to proinsulin. IGF-1 has short-term effects on the proliferation and differentiation of different cell types including cardiac myocytes. Its mitogenic activity is mediated by its binding to a IGF-1 receptor found on the cell surface [17,18]. Growth hormone (GH) is linked to IGF-1 receptor by IGF-1 promoting growth and tissue differentiation [19,20]. The direct effect of IGF-1 on cells is related to DNA synthesis, cell cycle gene modulation and induction of cell entry to the S phase. IGF-1 activation induces cell proliferation and increases protein synthesis, resulting in cell hypertrophy and promoting tissue protection. It also has an anti-apoptotic effect mediated by inhibition of Bax induction, caspase activation and DNA fragmentation [17,21,22]. Local myocardium activity of IGF-1 is most relevant than that produced elsewhere (i.e. in the liver). In fact, the bioavailability of exogenous administered IGF-1 is limited, because of the rapid clearance (half time < 10 min) of this peptide hormone from the circulation [23].

Some studies have evaluated the role of IGF-1 and GH in cardiac function and induction of myocyte damage after an ischemic heart attack. Both GH and IGF-1 have been shown to have a therapeutic effect on heart failure [19,20]. A study done in alcohol-fed rats demonstrated a reduction in IGF-1 mRNA content in liver and skeletal muscle, compared with pair-fed control rats [24]. An experimental study on IGF-1 in mice showed that over-expression of this growth hormone has a beneficial effect on the myocardial dysfunction caused by excessive consumption of alcohol [2]. No previous clinical investigations have studied the direct effect of alcohol on IGF-1 in humans.

Considering the previously noted pro-apoptotic effect of ethanol [14] as well as the up-regulation of myocyte myostatin, [16], and based on data from experimental studies on myocardial IGF-1 effect, we aimed to evaluate

the potential role of IGF-1 in the development of alcohol-induced cardiac damage. Thus, we hypothesized that chronic alcohol consumption has an inhibitory effect on IGF-1 expression, and may consequently worsen the recovery of damaged myocardial tissue. For this purpose, we studied samples of human myocardium tissue from organ donors. Donors were classified into different groups according to alcohol consumption, the presence of CMP or the existence of hypertension or other causes of myocardial damage. The main objective in the present study was to evaluate myocardium IGF-1 expression in human organ donors and determine the effect of chronic alcohol consumption, the presence of CMP, hypertension or other causes of myocardial damage.

## Results

We included a total of 57 hearts samples from human donors collected at the Hospital Clínic Transplant Unit between January 2006 to December 2008. One sample which was not adequately cryopreserved was excluded. Therefore, a total of 56 heart samples were finally evaluated. Heart samples were divided into 4 groups as follows: (1) 10 healthy donors without evidence of alcohol consumption, hypertension or other causes of heart disease (control group), (2) 16 non-alcoholic hypertensive donors, (3) 23 donors with chronic alcohol consumption and (4) 7 non-alcoholic donors with other causes of cardiac disease. Table 1 shows the epidemiological and clinical data of donors according to these four groups. Remarkably there were no differences related to age and gender distribution between groups. Alcoholics presented a higher tobacco use compared to healthy non-alcoholic donors. None of these subjects presented criteria of caloric or protein malnutrition. As expected, donors with chronic alcohol consumption, hypertension and other cardiac diseases presented significant changes in echocardiography parameters and also in morphometrical parameters of myocardial hypertrophy compared to controls.

To evaluate the effect of CMP on IGF-1 myocardial expression, these cases were further divided in 6 groups: (1) 10 healthy non-alcoholic donors, (2) 8 hypertensive non-alcoholic donors without CMP, (3) 8 hypertensive non-alcoholic donors with CMP, (4) 11 donors with chronic alcohol consumption without CMP, (5) 12 donors with chronic alcohol consumption with CMP and (6) 7 non-alcoholic donors with other causes of CMP (2 ischemic disease, 3 valve disease and 2 idiopathic CMP).

As expected, the cases (groups 2, 3, 4, 5 and 6) presented a higher cardiothoracic index, lower left ventricular ejection fraction and electrocardiogram abnormalities and showed a worse clinical class than controls (group 1). The consumption of daily alcohol intake ( $38.57 \pm 12.10$  vs.  $43.94 \pm 11.66$ , in g/day;  $p=0.676$ ) and lifetime dose of ethanol ( $5.04 \pm 2.54$  vs.  $3.50 \pm 1.10$



**Table 1 Epidemiologic and clinical data of the different groups of heart donors**

	Control donors (n=10)	Hypertensive donors (n=16)	Alcoholic donors (n=23)	Donors with other causes of cardiac disease (n=7)
Age (y; mean (SD))	52.3 (22.1)	62.1 (10.7)	54.3 (10.0)	59.1 (13.8)
Male/female ratio (n)	3:7	8:8	19:4	6:1
Daily alcohol intake (g; mean (SD))	0	10.7 (19.4)	148.2 (54.9)***	8.6 (22.8)
Lifetime dose of ethanol (kg ethanol/kg body weight; mean (SD))	0	0.54 (0.2)	15.5 (8.3)***	0.77 (0.2)
Active smokers [n (%)]	1 (10)	4 (25)	17 (74)***	2 (29)
Time from admission to donation (h; mean (SD))	30 (2)	30 (3)	33 (2)	30 (2)
NYHA function [n (%)]				
Class I	10 (100)	11 (68)	12 (51)	4 (57)
Class II	0	4 (26)	7 (30)	2 (29)
Classes III and IV	0	1 (6)	2 (9)	1 (14)
Cardiothoracic index (mean (SD))	0.47 (0.01)	0.54 (0.05)**	0.54 (0.05)**	0.58 (0.05)**
Electrocardiogram [abnormal cases; n (%)]	1 (10)	11 (69)*	10 (43)**	7 (100)*
Left ventricular ejection fraction (%; mean (SD))	61 (3)	45 (9)**	45 (7)**	41 (7)**
End-diastolic diameter (mm; mean (SD))	46.6 (2.2)	52.5 (5.1) **	58.4 (6.2) **	59.6 (6.4) **
End-systolic diameter (mm; mean (SD))	29.7 (2.9)	38.3 (3.8) **	43.8 (5.7) **	45.4 (6.2) **
Left ventricular mass (g/m <sup>2</sup> ; mean (SD))	107 (6)	139 (10) **	143 (11) **	146 (13) **
Cell hypertrophy [n (%)]	0 (0)	11 (69) **	17 (74) **	7 (100) **
Nuclear hypertrophy [n (%)]	0 (0)	14 (88) **	19 (82) **	7 (100) **

An abnormal electrocardiogram is characterized by the presence of rhythm disturbances, conduction defects, signs of left ventricular hypertrophy, or abnormal repolarization.

\* P < 0.05 compared to the other groups.

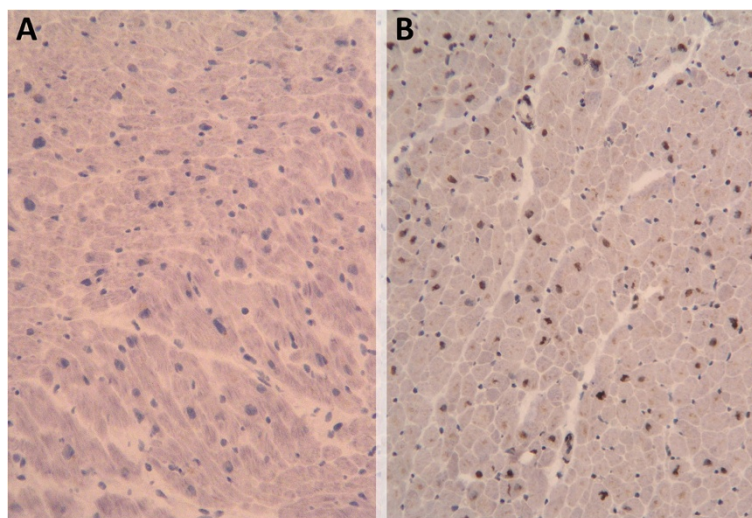
\*\* P < 0.01 compared with control donors.

\*\*\* P < 0.01 compared to the other groups.

in Kg of ethanol/Kg body weight;  $p=0.598$ ) and tobacco consumption ( $10.43 \pm 2.82$  vs.  $10.30 \pm 2.66$  in cigarettes/day;  $p=0.892$ ), was similar in the group of alcoholic donors when divided according to the presence of structural CMP.

#### IGF-1 immunohistochemical myocardial expression

We first evaluated the presence of appropriate immunohistochemical IGF-1 myocardial expression. Thus, samples without IGF-1 antibody were observed to be uniformly negative only with hematoxylin staining, whilst samples



**Figure 1** Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) immunohistochemical expression in myocardium at 10  $\mu$ m (magnification  $\times 100$ ). (A) Negative control without IGF-1 antibody. (B) Positive control sample from a healthy donor with IGF-1 antibody.

with IGF-1 antibody showed clearly positive expression of IGF-1, with dark brown staining in the nucleus (Figure 1). In a magnified image (Figure 2) we can see further staining in nuclear expression of cardiac cells with some showing clear IGF-1 expression and other cells with absent IGF-1 expression.

With respect to IGF-1 immunohistochemical expression, on division of the samples into healthy non-alcoholic donors (controls) and cases (the latter including hypertension, chronic alcohol consumption and other causes of cardiac disease), the IGF-1 expression index was  $0.0439 \pm 0.0127$  versus  $0.0219 \pm 0.0026$ , respectively, with a significant decrease in IGF-1 myocardial expression in cases compared to controls ( $p=0.007$ ) (Figure 3).

Then, we compared IGF-1 myocardial expression in healthy non-alcoholic donors used as controls with hypertensive donors, donors with chronic alcohol consumption and donors with other causes of cardiac disease separately (Table 2). Remarkably, we just found a significant decrease in IGF-1 myocardial expression on comparing donors with chronic alcohol consumption with controls ( $0.0206 \pm 0.0042$  vs.  $0.0439 \pm 0.0127$ , respectively,  $p=0.002$ ). Hypertensive donors tended to express low IGF-1 myocardial expression compared to controls, albeit without achieving statistical significance ( $0.0250 \pm 0.0043$  vs.  $0.0439 \pm 0.0127$ , respectively,  $p=0.068$ ).

In order to assess the influence of the presence of structural CMP in IGF-1 myocardial expression, we compared IGF-1 expression index in all cases and controls divided according to the presence or absence of structural CMP ( $n=29$  in donors without CMP donors, and  $n=27$  in donors with CMP). Thus, the IGF-1 myocardial expression

in the two groups did not significantly differ ( $0.0274 \pm 0.0053$  in donors without CMP compared to  $0.0241 \pm 0.0037$  in donors with CMP,  $p=0.749$ ). We also evaluated the relationship between IGF-1 myocardial activity and the presence myocyte hypertrophy. Thus, myocyte IGF-1 activity was higher in donors without nuclear morphometric hypertrophy than in donors with nuclear hypertrophy ( $0.037 \pm 0.009$  vs  $0.022 \pm 0.0038$ ,  $P= 0.020$ ). Similarly, IGF-1 myocyte activity in donors without cell hypertrophy was significantly higher compared to their counterpart not affected of cell hypertrophy ( $0.034 \pm 0.006$  vs  $0.020 \pm 0.002$ ,  $P= 0.048$ ). IGF-1 myocardial activity was similar in alcoholics with higher tobacco use and alcoholics with non-tobacco use.

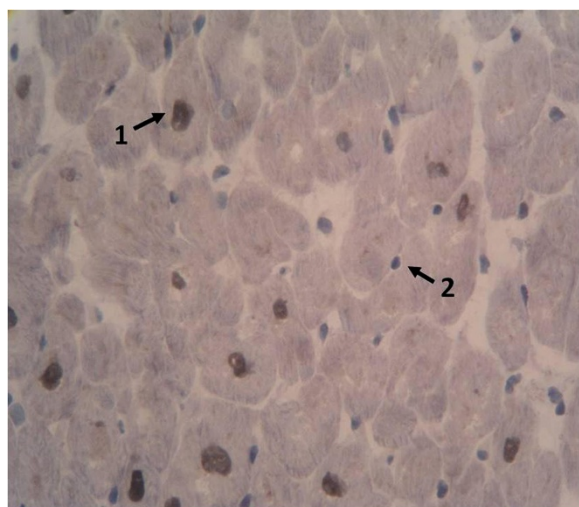
Finally, the IGF-1 myocardial expression of non-alcoholic healthy controls was separately compared with that of each group of cases according to the presence of structural CMP. Only the group of donors with chronic alcohol consumption non-affected of CMP showed significantly lower IGF-1 myocardial expression compared to non-alcoholic controls ( $0.0132 \pm 0.0012$  vs.  $0.0439 \pm 0.0127$ , respectively,  $p=0.000$ ). Donors with chronic alcohol consumption with CMP tended to express lower IGF-1 myocardial expression, but without achieving significant differences compared to non-alcoholic controls ( $0.0264 \pm 0.0074$  vs.  $0.0439 \pm 0.0127$ , respectively,  $p=0.069$ ). No differences were obtained on comparing the controls with the other groups of cases (Table 2). When we compare donors with chronic alcohol consumption with CMP versus chronic alcohol consumption without CMP no significant differences were found ( $p=0.169$ ).

Lastly, we performed a regression analysis between parameters of ethanol consumption and IGF-1 myocardial expression, but did not find a significant correlation between them ( $R^2= 0.0939$  for mean daily alcohol consumption and  $R^2 = 0.0759$  for lifetime cumulative dose of alcohol and IGF-1 myocardial expression, respectively).

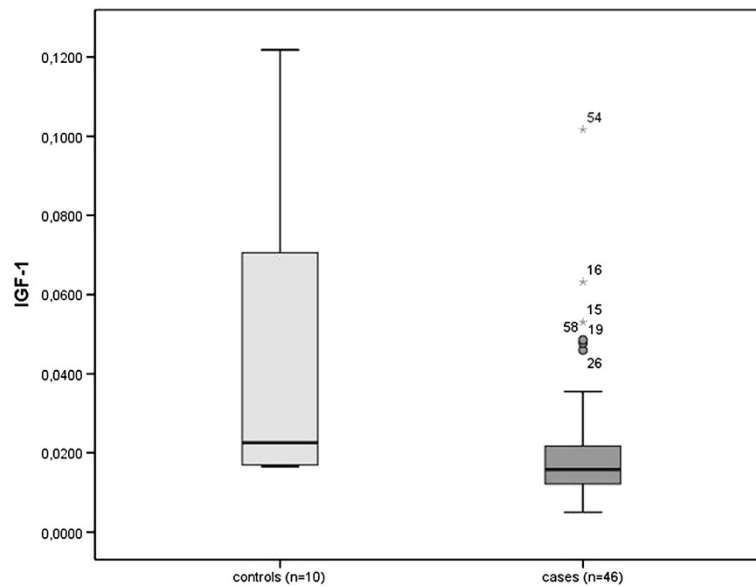
## Discussion

This study evaluates IGF-1 expression in myocardial tissue in human donors with chronic alcohol consumption in comparison to healthy donors and also with donors with hypertension or other cardiac diseases using an immunohistochemical IGF-1-specific assay. We attempted to assess the effect that chronic alcohol consumption may cause in IGF-1 myocardial expression in comparison to non-alcoholic controls and other different groups of donors and also evaluate the influence of the presence of structural CMP.

The main result achieved is the evidence that chronic alcohol consumption significantly reduces IGF-1 myocardial expression compared to non-alcoholic healthy controls. Otherwise, we did not observe significant differences in IGF-1 myocardial expression in the other



**Figure 2** Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) immunohistochemical expression in myocardium at 10  $\mu\text{m}$  (magnification  $\times 400$ ). (1) IGF-1 positive nuclear expression. (2) Negative nucleus without IGF-1 expression.



**Figure 3** Box-plot comparing healthy donors and cases with respect to Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) index expression ( $p=0.007$ ).

groups evaluated, although hypertensive donors showed a non-significant downward trend. Remarkably, IGF-1 myocardial expression was lower in donors with myocardial hypertrophy compared to those without hypertrophy. This finding probably is related to a negative counter-regulation between myocyte IGF-1 activity and cell hypertrophy, corroborating the influence of this factor on myocardial hypertrophy. Finally, on evaluating the influence of the presence of structural CMP on IGF-1 myocardial expression we did not find significant differences between groups with structural CMP and those without. This IGF-1 decreased myocardial expression in alcoholic donors was clearly significant in those without CMP thereby excluding an effect of structural CMP on a decrease in IGF-1 myocardial expression. In fact, the

presence of structural CMP in donors with chronic alcohol consumption non significantly increased IGF-1 myocardial expression with respect to donors without structural CMP, a fact that may be compensatory of the inflicted cardiac toxic damage. We also observed a downward trend in IGF-1 myocardial expression in the other groups of donors with hypertension and other cardiac diseases, although without achieving significant differences compared to controls.

Indeed, IGF-1 is a trophic factor with an important role and short-term effects on the proliferation and differentiation of different cell types including heart myocytes, IGF-1 increases cardiac DNA and protein synthesis and reduces protein degradation [17]. After myocardial infarction IGF-1 improves cardiac function by

**Table 2 Comparison of myocardial immunohistochemical studies in IGF-1 expression between the different groups**

Number of samples used for immunohistochemical study: n=56	IGF-1 myocardial expression	p-value compared with control donors
Control donors (n=10)	0.0439 (0.0127)	
Hypertensive donors (n=16)	0.0250 (0.0043)	0.068
Hypertensive donors without CMP (n=8)	0.0264 (0.0074)	0.101
Hypertensive donors with CMP (n=8)	0.0237 (0.0052)	0.173
Chronic alcohol consumption donors (n=23)	0.0206 (0.0042)	0.002
Chronic alcohol consumption donors without CMP (n=11)	0.0132 (0.0012)	0.000
Chronic alcohol consumption donors with CMP (n=12)	0.0264 (0.0074)	0.069
Donors with other causes of cardiac disease (n=7)	0.0191 (0.0014)	0.161

Data are expressed as IGF-1 index expression (SD).

IGF-1 Insulin-like Growth Factor.

CMP Cardiomyopathy.

stimulating contractility and promoting tissue remodeling, a decrease in IGF-1 expression affects myocardial function and myocyte regeneration [17,18].

The potential mechanism to explain this alcohol-mediated decrease in IGF-1 myocardial expression may be the decrease in protein synthesis and translation initiation that alcohol induces in the myocardium [25]. This effect causes a impairment in the availability and effectiveness of various anabolic hormones including IGF-1 [13] and myostatin [16]. These results are in concordance to those observed in experimental studies in mice in which alcohol-fed rats showed a reduction in the IGF-1 mRNA content in liver and skeletal muscle compared with pair-fed control rats [24]. In fact, it has been suggested that IGF-1 expression protects the myocardium tissue reducing apoptosis and increasing myocardial proliferation [17]. For this reason, an alcohol-induced IGF-1 myocardial decrease in expression is partly compensated in the presence of cardiac damage.

In the present series, alcohol donors consumed higher tobacco dose than non alcoholic donors. However, In the multivariate analysis we did not identify tobacco as a variable influencing myocardial IGF-1 expression. In addition, no biological effect between tobacco consumption and IGF-1 activity or expression has been reported up to now [26,27].

In the present study we did not obtain a significant correlation between alcohol consumption parameters and IGF-1 myocardial expression. This may be due to the fact that ethanol consumption in the donors studied was not high but rather slight or moderate. In addition, it is clear that ethanol has diverse pathogenic effects on the myocardium and the global noxious effect may be a sum of diverse implicated mechanisms such as disturbance in calcium transients, induction of apoptosis, an increase in myostatin expression or induction of oxidative damage [8,14,16].

With respect to the hypertensive donors included in this study, they showed a downward trend of IGF-1 myocardial expression compared to healthy donors. This is in concordance to what has been observed in previous studies, in which low levels of IGF-1 were found to be associated with hypertension in subjects without other cardiovascular diseases [28].

One limitation of the present study was that it evaluated IGF-1 myocardial expression in a medium-size group of human donors, without considering other pathogenic mechanisms that may also be potentially implicated in alcohol-induced cardiac damage. The present study does not include data in IGF signaling cascade or complementary *in vitro* studies. The degree of daily and lifetime alcohol consumption in the group of donors with alcohol consumption was only moderate, thus the effect of high-dose ethanol intake may not have been

considered in the present study. IGF-1 expression was only limited to cardiac immunohistochemical without IGF-1 receptor or intracellular IGF-1 signaling.

## Conclusions

We observed a significant decrease in IGF-1 myocardial expression in alcoholic donors without structural CMP compared to controls. This effect was not observed in donors with hypertension or other cause of cardiac disease. Since IGF-1 promotes cardiac growth, improves cardiac contractility, cardiac output, stroke volume, and ejection fraction, it has been suggested that IGF-1 has therapeutic potential [17,22]. As previously reported in an experimental study in mice, over-expression of IGF-1 has a beneficial effect on the myocardial dysfunction caused by excessive consumption of alcohol [2]. For this reason, a potential therapeutic use of IGF-1 could be suggested in patients with chronic alcohol consumption to avoid progression to CMP.

## Methods

### Selection of patients and controls

In the transplant unit at the Hospital Clínic subjects with brain death due to trauma or cerebrovascular causes are routinely evaluated for possible transplantation. Of these donors under the age of 70 years, hearts which were not suitable for transplantation were consecutively separated and classified into 4 groups: (1) control hearts from healthy non-alcoholic people who were not eligible for implantation because of a lack of matched receptor or size inadequacy, (2) hypertensive non-alcoholic donors, (3) donors with chronic alcohol consumption ( $\geq 60$  g/day for over 10 years), (4) non-alcoholic donors with other causes of cardiac disease (ischemic, valve or idiopathic).

All patients were white Caucasians of Spanish descent, who lived with their families in or around Barcelona and none was indigent. Some of these subjects had been included in previous studies on heart antioxidant status [8], cardiac apoptosis [14] and myostatin activity [16].

All cases had been admitted to the intensive care unit and ventilator and hemodynamic parameters had been appropriately maintained at normal values throughout hospitalization ( $\text{PaO}_2 > 60$  mm Hg, systolic blood pressure  $> 100$  mm Hg, and arterial pH within the normal range). None of the patients required in-hospital cardiopulmonary resuscitation maneuvers. Because all patients were maintained in similar conditions of glucose homeostasis, we consider that insulin do not play a significant role in the final measured myocardial IGF-1 activity.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic and informed consent was requested from the families of the donors concerning the use of myocardium tissue for this research protocol study. The authors of this manuscript have certified that

they comply with the statement on ethics from the HEART Group [29].

#### **Clinical and laboratory evaluation**

A detailed history of ethanol intake was retrospectively obtained by consultation with family members using a structured questionnaire ("time-line follow-back method") [30], as previously reported [10,11]. Duration of ethanol intake was calculated in each group as the total cumulated period of alcohol consumption in years, either recent or previous. The body mass index (BMI) was determined as the actual body weight relative to the square of the body height ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Patients were considered to have caloric malnutrition if the BMI was  $<17 \text{ kg}/\text{m}^2$ . Protein malnutrition was assessed by the following parameters obtained at hospital admission: hemoglobin, lymphocyte count, total protein, retinol-binding protein, prealbumin, and albumin.

#### **Cardiac studies**

Past and present signs and symptoms of heart failure were evaluated on consultation of medical records and with family members of the donors, and the New York Heart Association (NYHA) functional class was determined according to the Goldman activity scale [31]. Chest X-ray with measurement of cardiothoracic index and conventional electrocardiography were performed in all cases. A cardiothoracic index greater than 0.48 was observed in 27 patients compared to none of the controls. In these donors with enlarged cardiothoracic index, bidimensional echocardiography was performed (Hewlett Packard Sonos 2500; Hewlett Packard, Andover, MA). End-diastolic and end-systolic diameters, the shortening fraction, left ventricular (LV) mass, and the ejection fraction (EF) were measured according to the standards of the American Society of Echocardiography [32]. Cardiomyopathy (CMP) was defined as the presence of LVEF  $<50\%$  and LV enlargement. We observed a good correlation between the cardiothoracic index and the LV end-diastolic diameter ( $r=0.68$ ,  $p<0.01$ ). The personnel performing and evaluating these tests had no knowledge of the alcoholic history of the patients.

#### **Myocardium histological studies**

A 3 cm distal sample of the LV apex was surgically excised avoiding damaged areas (total weight of 4 to 5 grams) at the time the donor was under cold perfusion. The specimen was cut into fragments, and one of these was processed for further histological analysis.

#### **Immunohistochemistry**

Myocardial samples were preserved at  $-80^\circ\text{C}$ . Immunohistochemical processing required cutting of samples to  $10 \mu\text{M}$  using cryotome and fixation on glass slides. The slices were kept frozen ( $-80^\circ\text{C}$ ) until the time of use.

Slices were fixed with acetone for 10 minutes and then proceed to warming in the oven at  $95^\circ\text{C}$  for 30 minutes with citrate buffer (2.94 g Tri-sodium citrate + 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.5 ml Tween 20 at pH 6 with HCl 1N) and let cool for 20 minutes at room temperature. Slices were cleaned with PBS and blocked with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%) for 15 minutes and were thereafter cleaned again with PBS.

Immunohistochemical analysis for IGF-1 expression was chosen because myocardial IGF-1 expression was considered to be the most relevant parameter in the physiopathology of myocardial IGF-1 effects, as previously reported in other studies [33,34]. Immunohistochemical detection of IGF-1 expression was evaluated using a commercial kit of a polyclonal rabbit antibody (IGF-1 antibody, ab9572, Abcam, Cambridge, UK). The antibody is a recombinant immunogen (human Insulin-like Growth Factor-1). The antibody dilution used was  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  in a solution of blocking serum 1.5% in PBS and was incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . In each sample we also performed a negative control processed without primary antibody. Detection was performed by the compatible secondary antibody (rabbit ABC Staining System, sc-2018, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) linked to peroxidase. A last cleaning with  $\text{H}_2\text{O}$  was performed and slices were stained with Gill's hematoxylin 2 for 10 minutes and cleaned with  $\text{H}_2\text{O}$  for 5 minutes. Finally, slides were prepared with an aqueous mounting agent (Aquatex, Darmstadt, Germany).

#### **Microscopic evaluation**

Myocardial cell and nuclear hypertrophy was evaluated by histological morphometry, as previously reported [11]. IGF-1 myocardial expression was evaluated with immunohistochemical methods using optical microscopy at  $\times 200$  magnification with a semiquantitative approach, counting the percentage of positive cells with respect to total evaluated myocardial cells. We measured the positive IGF-1 expression in both the nucleus and cytoplasm of the myocytes. Six areas of each sample were evaluated, including 200 to 600 cells per field. A minimum of 1,200 cells per sample were counted. IGF-1 expression index was calculated according to the ratio between positive-stained myocytes divided by negative-stained myocytes. Results from control donors were compared to those of hypertensive, chronic alcohol consumers and donors with other causes of cardiac disease. In the three last groups we also analyzed the effect of the presence of structural CMP on IGF-1 myocardial expression.

#### **Statistical analysis**

The data were analyzed using SPSS-PC 18.0 statistical software (SPSS, Chicago, IL). Firstly, descriptive statistics were calculated and tested for normality (Kolmogorov-Smirnov). Although the groups follow a normal distribution due to

the small sample size, we used a nonparametric test (Mann–Whitney) to assess the presence of significant differences between the parameters studied. A significance level lower than 0.05 was used.

#### Abbreviations

CMP: Cardiomyopathy; EF: Ejection fraction; GH: Growth hormone; IGF-1: Insulin-like growth factor-1; LV: Left ventricular.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

JF carried out the study design and participated in the critical review of the manuscript. FB participated in the study design, the histological evaluation, the immunohistochemical study, the statistical review and helped to draft the manuscript. EA carried out the sample collection from human donors. ET participated in the study design histological evaluation and the immunohistochemical study. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported by SRG 2009–1158, Generalitat de Catalunya, Spain, and also by the research network CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Received: 19 January 2013 Accepted: 2 April 2013

Published: 1 October 2013

#### References

- Mowla R, Figueredo VM: Alcohol and the heart: to abstain or not to abstain? *Int J Cardiol* 2012, **164**:267–276.
- Zhang B, Turdi S, Li Q, Lopez FL, Eason AR, Anversa P, Ren J: Cardiac overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction but not hypertrophy: roles of Akt, mTOR, GSK3 $\beta$ , and PTEN. *Free Radical Bio Med* 2010, **49**:1238–1253.
- Preedy VR, Adachi J, Peters TJ, Worrall S, Parkkila S, Niemela O, Asamo M, Ueno Y, Takeda K, Yamauchi M, et al: Recent advances in the pathology of alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 2001, **25**:545–595.
- Spies CD, Sander M, Stangl K, Fernandez-Solà J, Preedy VR, Rubin E, Andreasson S, Hanna EZ, Kox WJ: Effects of alcohol on the heart. *Curr Opin Crit Care* 2001, **7**:337–343.
- Urbano-Márquez A, Fernández-Solà J: Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. *Muscle Nerve* 2004, **30**:689–707.
- Ren J, Wold LE: Mechanisms of alcoholic heart disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008, **2**:497–506.
- Fernández-Solà J, Estruch R, Urbano-Márquez A: Alcohol and heart muscle disease. *Addict Biol* 1997, **2**:9–17.
- Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badía E, Sacanella E, Estruch R, Nicolás J-M: Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2005, **29**:864–870.
- Fatjó F, Sancho-Bru P, Fernández-Solà J, Sacanella E, Estruch R, Bataller R, Nicolás J-M: Up-regulation of myocardial L-type Ca<sup>2+</sup> channel in chronic alcoholic subjects without cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 2007, **31**:1099–1105.
- Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-Lopez F, Grau JM, Mont L, Rubin E: The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *New Engl J Med* 1989, **320**:409–415.
- Fernandez-Solà J, Estruch R, Grau JM, Pare JC, Rubin E, Urbano-Márquez A: The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1994, **120**:529–536.
- Preedy VR, Patel VB, Why HJF, Corbett JM, Dunn MJ, Richardson PJ: Alcohol and the heart: biochemical alterations. *Cardiovasc Res* 1996, **31**:139–147.
- Lang CH, Kimball SR, Frost RA, Vary TC: Alcohol myopathy: impairment of protein synthesis and translation initiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, **33**:457–473.
- Fernández-Solà J, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, Urbano-Márquez A, Nicolás J-M: Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Hum Pathol* 2006, **37**:1100–1110.
- Joullia-Ekaza D, Cabello G: Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res* 2006, **312**:2401–2414.
- Fernández-Solà J, Lluís M, Sacanella E, Estruch R, Antúnez E, Urbano-Márquez A: Increased myostatin activity and decreased myocyte proliferation in chronic alcoholic cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 2011, **35**:1–10.
- Ren J, Samson WK, Sowers JR: Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999, **31**:2049–2061.
- Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995, **16**:143–163.
- Dean RG, Bach LA, Burrell LM: Upregulation of cardiac insulin-like growth factor-I receptor by ACE inhibition after myocardial infarction: potential role in remodeling. *J Histochem Cytochem* 2003, **51**:831–839.
- Delafontaine P: Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1995, **30**:825–834.
- Sell C, Baserga R, Rubin R: Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995, **55**:303–306.
- Jones JL, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995, **16**:3–34.
- Fan J, Char D, Kolasa AJ, Pan W, Maitra SR, Patlak CS, Spolarics Z, Gelato MC, Lang CH: Alterations in hepatic production and peripheral clearance of IGF-I after endotoxin. *Am J Physiol-Endoc M* 1995, **269**:E33–E42.
- Lang CH, Frost RA, Svanberg E, Vary TC: IGF-I/IGFBP-3 ameliorates alterations in protein synthesis, eIF4E availability, and myostatin in alcohol-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **286**:E916–E926.
- Niemelä O, Parkkila S, Worrall S, Emery PW, Preedy VR: Generation of aldehyde-derived protein modifications in ethanol-exposed heart. *Alcohol Clin Exp Res* 2003, **27**:1987–1992.
- Chelchowska M, Gajewska J, Ambroszkiewicz J, Blumska-Janiak M, Maciejewski T, Laskowska-Klita T: The effect of tobacco smoking on serum concentration of IGF-I and its binding proteins IGFBP-3 and IGFBP-4 in pregnant women. *Przegląd Lekarski* 2010, **67**:893–896.
- Palmer R, Wilson R, Coward P, Scott D: Analysis of circulating insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding protein-3 (IGFBP-3) in tobacco smokers and non-smokers. *Tob Induc Dis* 2003, **1**:157–170.
- Colao A, Di Somma C, Cascella T, Pivonello R, Vitale G, Grasso LFS, Lombardi G, Savastano S: Relationships between serum IGF1 levels, blood pressure, and glucose tolerance: an observational, exploratory study in 404 subjects. *Eur J Endocrinol* 2008, **159**:389–397.
- Ector H, Lancellotti P, Roberts WC, Wenger NK, Moss AJ, Smith ER, Borer JS, Eagle KA, Freedman J, Krum H, et al: A statement on ethics from the HEART Group. *JACC Cardiovasc Imaging* 2008, **1**:410–412.
- de Vries J, Lemmens P, Pietinen P, Kok F: Assessment of alcohol consumption. In *Health issues related to Alcohol Consumption*, Volume 2. 2nd edition. Edited by MacDonald I. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science; 1999:28–62.
- Goldman L, Hashimoto B, Cook E, Loscalzo A: Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation* 1981, **64**:1227–1234.
- Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, Manning WJ, Morehead A, Kitzman D, Oh J, Quinones M, et al: American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials: a report from the american society of echocardiography's guidelines and standards committee and the task force on echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr* 2004, **17**:1086–1119.
- Yi C, Ma C, Xie Z, Zhang G, Song W, Zhou X, Cao Y: Down-regulation of programmed cell death 5 by insulin-like growth factor 1 in osteoarthritis chondrocytes. *Int Orthop* 2013, **37**:937–943.
- Tong D, Wu X, Sun H, Jin Y, Liu Z, Zhou F: Expression changes and regulation of AR and IGF-1 in PC3 prostate cancer cells treated with sexual hormones and flutamide. *Tumor Biol* 2012, **33**:2151–2158.

doi:10.1186/2050-490X-1-3

Cite this article as: Borrisser-Pairó et al.: Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption. *Regenerative Medicine Research* 2013 **1**:3.

#### IV.1.1 Resum dels principals resultats obtinguts en l'estudi d'IGF-1

En aquesta fase de l'estudi es van incloure un total de 56 mostres de cor obtingudes a través de la Unitat de Transplantament de l'Hospital Clínic entre el gener de 2006 al desembre de 2008.

Es van classificar inicialment 4 grups de donants: donants sans, donants hipertensos, donants amb consum excessiu d'alcohol i donants amb altres causes de malaltia cardíaca. Les característiques clíniques dels diferents grups de donants es descriuen a la **Taula 4**.

**Taula 4. Dades clíniques i epidemiològiques dels diferents grups de donants**

	Controls sans (n=10)	Hipertensos (n=16)	Alcohòlics (n=23)	Donants amb altres miocardiopaties (n=7)
Edat (y; mitjana (SD))	52,3 (22,1)	62,1 (10,7)	54,3 (10,0)	59,1 (13,8)
Ratio home/dona (n)	3:7	8:8	19:4	6:1
Ingesta diària d'alcohol (g; mitjana (SD))	0	10,7 (19,4)	148,2 (54,9)***	8,6 (22,8)
Dosi acumulada d'etanol (kg etanol/kg pes; mitjana (SD))	0	0,54 (0,2)	15,5 (8,3)***	0,77 (0,2)
Fumadors actius [n (%)]	1 (10)	4 (25)	17 (74)***	2 (29)
Temps des de l'admissió a la donació (h; mitjana (SD))	30 (2)	30 (3)	33 (2)	30 (2)
Funció NYHA [n (%)]				
Classe I	10 (100)	11 (68)	12 (51)	4 (57)
Classe II	0	4 (26)	7 (30)	2 (29)
Classes III i IV	0	1 (6)	2 (9)	1 (14)
Índex cardioràdic (mitjana (SD))	0,47 (0,01)	0,54 (0,05)**	0,54 (0,05)**	0,58 (0,05)**
Electrocardiograma (casos anormals; n (%))	1 (10)	11 (69)*	10 (43)**	7 (100)*
Fracció d'ejecció ventricle esquerre (%;mitjana (SD))	61 (3)	45 (9)**	45 (7)**	41 (7)**
Diàmetre diastòlic final (mm; mitjana (SD))	46,6 (2,2)	52,5 (5,1) **	58,4 (6,2) **	59,6 (6,4) **
Diàmetre sistòlic final (mm; mitjana (SD))	29,7 (2,9)	38,3 (3,8) **	43,8 (5,7) **	45,4(6,2) **
Massa ventricular esquerra (g/m <sup>2</sup> ;mean (SD))	107 (6)	139 (10) **	143 (11) **	146 (13) **
Hipertròfia cel·lular [n (%)]	0 (0)	11 (69) **	17 (74) **	7 (100) **
Hipertròfia nuclear [n (%)]	0 (0)	14 (88) **	19 (82) **	7 (100) **

NYHA: New York Heart Association.

SD: desviació estàndard

Un electrocardiograma anormal es caracteritza per la presència d'alteracions del ritme, defectes de conducció, signes d'hipertròfia ventricular esquerra o repolarització anormal.

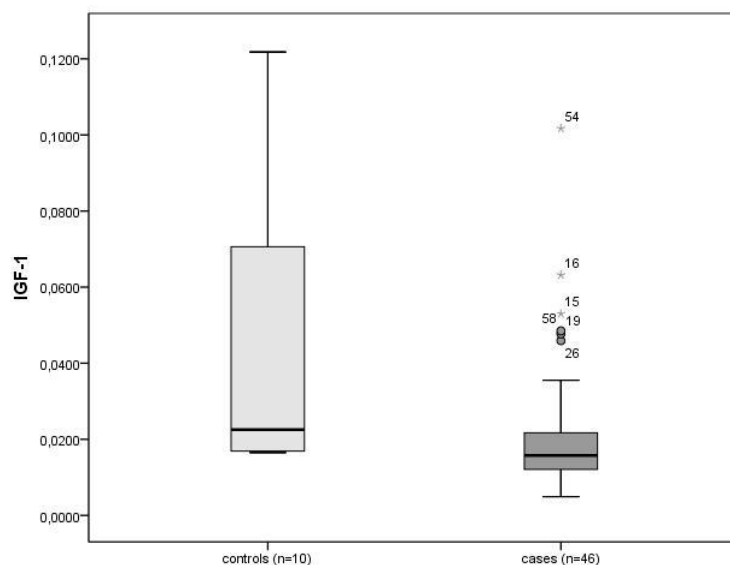
\* P < 0.05 comparat amb els altres grups.

\*\* P < 0.01 comparat amb els donants control.

\*\*\* P < 0.01 comparat amb els altres grups.

No es van observar diferències entre els diferents grups en funció de l'edat i el sexe. Una diferència que es va detectar és que el consum de tabac en els donants amb consum excessiu d'alcohol era major que en els donants sans. Es van detectar canvis significatius en els paràmetres de l'electrocardiograma i en els paràmetres de hipertròfia miocardiàca nuclear i cel·lular en els donants amb patologia respecte els donants sans.

Pel que fa a l'expressió miocardiàca de IGF-1, si es comparen els resultats dels donants sans amb els altres grups (casos) junts, els donants sans mostren uns índex significativament superiors que els casos (**Figura 13**).



**Figura 13.** Comparació d'expressió miocardiàca d'IGF-1 entre els donants sans i els casos ( $P=0.007$ )

La **Taula 5** analitza els índexs d'expressió miocardiàca d'IGF-1 per cada grup comparat amb els donants sans. Els donants amb consum excessiu d'alcohol presenten índexs significativament inferiors que els donants sans. Tot i que si es té en compte la presència de miocardiopatia, aquesta diferència deixa



de ser significativa en els donants amb consum excessiu d'alcohol i miocardiopatia. Per altra banda, els donants amb hipertensió o amb altres patologies cardíaques no presenten diferències en l'expressió d'IGF-1 respecte els controls.

**Taula 5. Comparació dels estudis immunohistoquímics en l'expressió d'IGF-1 entre els diferents grups de donants**

Grup de donants (n=56)	Índex d'expressió miocardiàca d'IGF-1	p-valor en comparació als donants sans
Donants sans (n=10)	0,0439 ± 0,0127	
Donants hipertensos (n=16)	0,0250 ± 0,0043	0,068
Donants hipertensos sense MCP (n=8)	0,0264 ± 0,0074	0,101
Donants hipertensos amb MCP (n=8)	0,0237 ± 0,0052	0,173
Donants amb consum excessiu d'alcohol (n=23)	0,0206 ± 0,0042	0,002*
Donants amb consum excessiu d'alcohol sense MCP (n=11)	0,0132 ± 0,0012	0,000*
Donants amb consum excessiu d'alcohol amb MCP (n=12)	0,0264 ± 0,0074	0,069
Donants amb altres causes de miocardiopatia (n=7)	0,0191 ± 0,0014	0,161

IGF-1: *insuline-like growth factor-1*; MCP: miocardiopatia

\*P < 0.05

Es va analitzar també l'expressió miocardiàca d'IGF-1 en funció de la presència o no d'hipertròfia nuclear i cel·lular. Aquells donants sense hipertròfia nuclear van presentar valors significativament superiors als donants amb hipertròfia nuclear ( $0.037 \pm 0.009$  vs.  $0.022 \pm 0.004$ ,  $p= 0.020$ ). Aquells donants sense hipertròfia cel·lular van presentar valors significativament superiors als donants amb hipertròfia cel·lular ( $0.034 \pm 0.006$  vs  $0.020 \pm 0.002$ ,  $p= 0.048$ ). Respecte el tabaquisme, no es van observar diferències significatives en l'expressió miocardiàca d'IGF-1 entre els donants alcohòlics amb i sense consum de tabac.



**IV.2 Article 2: Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors**

Joaquim Fernández-Solà, Francesc Borrissier-Pairó, Emilia Antúnez i Ester Tobías (2015). *Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors*. Journal of Hypertension 33(4):851-858.

DOI: <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000493>



# Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors

Joaquim Fernández-Solà, Francesc Borrissier-Pairó, Emilia Antúnez, and Ester Tobías

**Objective:** The physiopathological mechanisms implicated in hypertensive heart disease are multi-factorial, including myocyte hypertrophy, apoptosis and myocardial remodelling. In this process, some hormonal and local growth factors have a regulatory influence. The aim of this study was to evaluate the potential role of myostatin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) myocardial expression in the development of hypertensive-induced cardiac damage.

**Methods:** Samples of human myocardium tissue from organ donors were prospectively collected and classified according to the presence of hypertension, alcohol consumption, other causes of myocardial damage and the presence of structural cardiomyopathy (CMP). Myocardial samples were studied by immunohistochemistry and myostatin, and IGF-1 myocardial expression was evaluated in all the different groups of donors. Hypertensive donors were compared to other groups.

**Results:** A total of 66 heart samples from human donors were collected: 33 donors had no previous or present history of hypertension and 33 donors presented defined hypertension. Donors with hypertension presented higher myocyte cell and nuclear hypertrophy and showed similar myostatin myocardial expression as controls, but lower IGF-1 myocardial expression. Myostatin expression was significantly higher in hypertensive donors with CMP compared to non-hypertensive healthy donors. The presence of CMP of diverse origin (alcoholic, valve and coronary) also significantly increased myostatin myocardial expression.

**Conclusion:** The presence of hypertension significantly decreases IGF-1 myocardial expression. Myostatin myocardial expression increases in the presence of structural CMP either of hypertensive or other origin. These effects open the possibility of modulating hypertensive-induced cardiac damage.

**Keywords:** cardiac remodelling, cardiomyopathy, hypertension, IGF-1, myostatin

**Abbreviations:** AHT, arterial hypertension; CHF, chronic heart failure; CMP, cardiomyopathy; GH, growth hormone; HHD, hypertensive heart disease; IGF-1, insulin-like growth factor-1; LVEF, left-ventricular ejection fraction

## BACKGROUND

The heart is one of the major organs affected in patients with long-term hypertension. Up to 20% of patients with definite hypertension and 80% of those with severe hypertension develop functional or structural heart changes, leading to diastolic dysfunction, progressive left-ventricular hypertrophy and systolic dysfunction, and chronic heart failure (CHF), known as hypertensive heart disease (HHD) [1]. The morbidity and mortality of patients with HHD are elevated because of arrhythmias, congestive heart failure, myocardial infarction and sudden cardiac death [2]. In fact, arterial hypertension (AHT) is the most important risk factor for heart failure [3]. Antihypertensive therapy and regression of left-ventricular hypertrophic growth is related to a minor risk of cardiovascular events in patients with hypertension [4]. For this reason, one of the main objectives of treatment in hypertensive patients is to control the pathologic processes that intermediate left-ventricular pathologic hypertrophic growth, ventricular dysfunction and CHF [5,6]. In the transition from compensated to decompensated pressure overload hypertrophy, although cardiomyocyte loss is considered one of the determinants of the maladaptive process [1], other mechanisms such as extracellular matrix remodelling [7] and changes in the matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of metalloproteinases (MMP/TIMP) ratio [8] play a major role. Diverse myocyte growth factors such as myostatin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) may potentially regulate the development of heart damage in different clinical situations [9,10].

Myostatin is the growth differentiation factor-8 (GF-1 $\beta$ ), a potent inhibitor of skeletal muscle and heart growth [11]. When up-regulated, myostatin inhibits the proliferation of

Journal of Hypertension 2015, 33:851–859

Alcohol Research Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III (IF-S), Department of Medicine, University of Barcelona, Catalunya, Spain

Correspondence to Joaquim Fernández-Solà, Department of Internal Medicine, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 2273386; fax: +34 93 2279236; e-mail: jfernand@clinic.ub.es

**Received** 8 January 2014 **Revised** 14 November 2014 **Accepted** 14 November 2014  
J Hypertens 33:851–859 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI:10.1097/HJH.0000000000000493

muscle and cardiac myocytes and is therefore down-regulated during tissue development [11]. An increase in myostatin activity protects the cell from apoptosis. Its disruption causes increased skeletal and cardiac mass with myocyte hypertrophy and hyperplasia and increased proliferation [11,12]. In a previous study, we reported an increase in myostatin myocardium expression in patients with cardiomyopathy (CMP), either of alcoholic or other origin [13]. However, the specific role of myostatin in HHD has not been evaluated.

IGF-1 is important in cardiomyocyte survival [14]. IGF-1 has short-term effects on the proliferation and differentiation of different cell types including cardiac myocytes [15–18]. IGF-1 activation induces cell proliferation and increases protein synthesis, resulting in cell hypertrophy and promoting tissue protection. It also has an anti-apoptotic effect [18–20]. Local myocardium activity of IGF-1 is more relevant than that produced elsewhere (i.e. in the liver). In fact, the bioavailability of exogenously administered IGF-1 is limited [21]. Insulin-like growth factor II receptor (IGF-IIR) gene expression/suppression is able to prevent myocardial remodelling [22]. IGF-1 activity may contribute to cardiomyoblast apoptosis via calcineurin signalling [23].

Some studies have evaluated the role of IGF-1 and growth hormone (GH) in cardiac function and the induction of myocyte damage after an ischaemic heart attack [15]. Both GH and IGF-1 have been shown to have a therapeutic effect on heart failure [16]. In spontaneously hypertensive rats, there is a differential protein expression in hypertrophic hearts with and without hypertension. Alcohol-fed rats showed a reduction in liver and skeletal muscle IGF-1 mRNA content compared with pair-fed control rats [24]. An experimental study on IGF-1 in mice showed that over-expression of this GH has a beneficial effect on the myocardial dysfunction caused by excessive alcohol consumption [25]. In relation to AHT, Colao *et al.* [26] described low levels of IGF-1 in hypertensive patients without other cardiovascular diseases. In the presence of CMP, high levels of circulating IGF-1 have been reported in patients with essential hypertension, suggesting the up-regulation of IGF-1 in hypertensive CMP [27,28]. In a recent study, we observed a non-significant downward trend of IGF-1 myocardial expression in AHT compared to the non-hypertensive controls [29]. No other clinical investigations have studied the direct effect of AHT on myocardial IGF-1 expression in humans. All these findings clearly attest to the role of various paracrine hormonal systems and the multi-factorial pathogenesis of left ventricular hypertrophy, in particular, in the HHD syndrome [1].

Alcohol consumption is another factor that may intervene in the development of heart damage in AHT. Thus, left ventricular hypertrophy is more common in patients with essential hypertension who regularly drink more than 50 g/day, and in whom the left ventricular mass index is proportional to the amount of alcohol hypertrophy, being at risk of developing atrial fibrillation [30].

Considering the previous pathogenic aspects of HHD in which myocyte hypertrophy, apoptosis and myocardial remodelling have an essential role and a regulatory influence of some hormonal and local growth factors, we hypothesized that hypertension produces an increased

effect on myocardial apoptosis and disturbs remodelling. This effect may be partially mediated by myocardial myostatin and IGF-1 expression as regulatory mechanisms. The main objective of the present study was therefore to evaluate myostatin and IGF-1 myocardial expression in human organ donors with AHT, and determine the influence of this expression in the development of consequent heart damage.

## METHODS

### Selection of patients and controls

The hearts of patients with brain death either of traumatic or cerebrovascular origin are routinely evaluated in the transplant unit of the Hospital Clinic for possible transplantation. Hearts not suitable for transplantation from donors under 70 years of age were consecutively separated and classified into four groups: control hearts from healthy non-alcoholic people who were not eligible for implantation because of a lack of matched receptor or size inadequacy, hypertensive non-alcoholic donors, donors with chronic alcohol consumption ( $\geq 60$  g/day for over 10 years) and non-alcoholic donors with other causes of cardiac disease (ischaemic, valve or idiopathic).

All patients were white Caucasians of Spanish descent, who lived with their families in or around Barcelona, and none was indigent. Some of these patients had been included in previous studies on heart antioxidant status [31], cardiac apoptosis [32] and myostatin myocardial expression [13].

All cases had been admitted to the ICU, and ventilator and haemodynamic parameters had been appropriately maintained at normal values throughout hospitalization (PaO<sub>2</sub> >60 mmHg, SBP >100 mmHg and arterial pH within the normal range). None of the patients required in-hospital cardiopulmonary resuscitation manoeuvres. Since all patients were maintained in similar conditions of glucose homeostasis, we considered that insulin did not play a significant role in the final IGF-1 myocardial expression determined.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic, and informed consent was requested from the families of the donors concerning the use of myocardium tissue for this research protocol study. The authors of this manuscript certify having complied with the statement on ethics from the HEART group [33].

### Clinical and laboratory evaluation

Hypertension was defined as values of SBP at least 140 mmHg and/or DBP at least 90 mmHg, based on the evidence from randomized controlled trials showing that treatment-induced blood pressure reductions are beneficial in patients with these blood pressure values [34].

A detailed history of ethanol intake was retrospectively obtained by consultation with family members using a structured questionnaire ('time-line follow-back method') [35], as previously reported [36,37]. The duration of ethanol intake was calculated in each group as the total cumulated period of alcohol consumption in years, either recent or previous. The BMI was determined as the actual body weight relative to the square of the body height (kg/m<sup>2</sup>). Patients were considered to have caloric malnutrition if the

BMI was below 17 kg/m<sup>2</sup>. Protein malnutrition was assessed by the following parameters obtained at hospital admission: haemoglobin, lymphocyte count, total protein, retinol-binding protein, pre-albumin and albumin.

### Cardiac studies

Past and present signs and symptoms of heart failure were evaluated on consultation of medical records and with family members of the donors, and the New York Heart Association (NYHA) functional class was determined according to the Goldman activity scale [38]. Chest radiography with measurement of the cardiothoracic index and conventional electrocardiography were performed in all cases. A cardiothoracic index greater than 0.48 was observed in 27 patients, compared to none of the controls. Bi-dimensional echocardiography was performed (Hewlett Packard Sonos 2500; Hewlett Packard, Andover, Massachusetts, USA) in the donors with a high cardiothoracic index. End-diastolic and end-systolic diameters, the shortening fraction, left ventricular mass, and the ejection fraction were measured according to the standards of the American Society of Echocardiography [39]. CMP was defined as the presence of a left-ventricular ejection fraction (LVEF) below 50% and left-ventricular enlargement. We observed a good correlation between the cardiothoracic index and the left-ventricular end-diastolic diameter ( $r=0.68$ ,  $P<0.01$ ). The personnel performing and evaluating these tests had no knowledge of the alcoholic history of the patients.

### Myocardium histological studies

A 3 cm distal sample of the left-ventricular apex was surgically excised avoiding damaged areas (total weight of 4–5 g) at the time the donor was under cold perfusion. The specimen was cut into fragments, and one of these was processed for further histological analysis. Myocardial samples were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Immunohistochemical processing required cutting of samples to 10  $\mu\text{mol/l}$  using cryotome and fixation on glass slides. The slices were kept frozen ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) until the time of use.

### Myostatin immunohistochemistry

The myostatin (GF- $\beta$ 1) myocardium assay was performed using a commercial kit with the monoclonal antibody (GDF8-ab996-datasheer; Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) with human specificity for myostatin. This antibody has an immunogen sequence common to myostatin and its precursor AA 348–364 (NMLYFNGKE-QIIIGKI) that detects all the forms of myostatin: precursor, dimers and monomers. Dilution was performed at 1/1000 in a buffer-citrate solution at pH 6.0. Lecture was performed by the compatible secondary antibody ab6722 linked to peroxidase. This antibody has nuclear and cytoplasmic reactivity. To demonstrate the anti-myostatin antibody specificity of this antibody, we used muscle specimens from myostatin knockout mice (Se-Jin Lee, Molecular Biology & Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA) and compared the reactivity to the muscle of wild-type mice.

### Insulin-like growth factor-1 immunohistochemistry

Slices were fixed with acetone for 10 min and then warmed in an oven at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 min with citrate buffer (2.94 g trisodium citrate + 1000 ml H<sub>2</sub>O + 0.5 ml Tween 20 at pH 6 with HCl 1N) and let cool for 20 min at room temperature. Slices were cleaned with PBS and blocked with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) for 15 min and were thereafter cleaned again with PBS. Immunohistochemical detection of IGF-1 expression was evaluated using a commercial kit of a polyclonal rabbit antibody (IGF-1 antibody, ab9572; Abcam, Cambridge, UK). This antibody is a recombinant immunogen (human IGF-1). The antibody dilution used was 4  $\mu\text{g/ml}$  in a solution of blocking serum 1.5% in PBS and was incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . In each sample, we also performed a negative control processed without primary antibody. Detection was performed by the compatible secondary antibody (rabbit ABC Staining System, sc-2018; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA) linked to peroxidase. A last cleaning with H<sub>2</sub>O was performed and slices were stained with Gill's haematoxylin 2 for 10 min and cleaned with H<sub>2</sub>O for 5 min. Finally, slides were prepared with an aqueous mounting agent (Aquatex, Darmstadt, Germany).

### Microscopic evaluation

Myocardial cell and nuclear hypertrophy, fibrosis and necrosis were evaluated by histological morphometry of each sample, as previously reported [36]. Myostatin and IGF-1 myocardial expression was performed using optical microscopy at  $\times 200$  magnification by means of a semi-quantitative study evaluating the percentage of positive cells with respect to the total myocardial cells evaluated. In each case, a minimum of 3000 myocytes were evaluated. We compared the results of cases (alcoholics) with healthy donors and also pathological controls with either hypertension or other causes of CMP. The positive myostatin and IGF-1 expression in both the nucleus and cytoplasm of the myocytes was measured. Six areas of each sample were evaluated, including 200–600 cells per field. A minimum of 1200 cells per sample were counted. IGF-1 and the myostatin expression index were calculated according to the ratio between positive-stained myocytes divided by negative-stained myocytes. Immunohistochemical evaluation was performed by two independent evaluators. The intra-observer reproducibility of results was 95% and the inter-observer reproducibility 91%. In the case of discrepancy, an open discussion was performed, considering the opinion of a third evaluator if agreement was not achieved.

### Statistical analysis

The results of hypertensive donors were compared to other groups. The data were analysed using SPSS-PC 18.0 statistical software (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Firstly, descriptive statistics were calculated and tested for normality (Kolmogorov–Smirnov). Although the groups followed a normal distribution due to the small sample size, we used a non-parametric test (Mann–Whitney) to assess the presence of significant differences between the parameters studied. A significance level lower than 0.05 was used.

## RESULTS

A total of 66 hearts samples from human donors collected at the Hospital Clinic Transplant Unit from January 2006 to December 2008 were included in this study.

### Effect of hypertension

In the first step, all heart samples were divided according to the presence of AHT; 33 donors had no previous or present history of hypertension and 33 donors had defined hypertension. The epidemiological data are shown in Table 1. None of these patients presented criteria of caloric or protein malnutrition.

We evaluated the myocardial histological findings, specifically cell and nuclear hypertrophy, fibrosis and necrosis. The results are shown in Table 2. Nuclear and/or cell hypertrophy was significantly higher in donors with hypertension ( $P=0.004$ ).

In the immunohistochemical myocardial analysis, the myostatin myocardial expression in control donors was similar to that of donors with hypertension ( $8.573 \pm 1.0546$  vs.  $10.756 \pm 1.1667$ , respectively;  $P=0.222$ ). IGF-1 expression was  $3.083 \pm 0.5885$  in non-hypertensive controls versus  $1.980 \pm 0.2824$  in donors with hypertension, with a significant decrease in the latter ( $P=0.035$ ). Figure 1 shows the distribution of samples in each group for myostatin and IGF-1 myocardial expression.

### Effect of alcohol

In order to know the effect of chronic alcohol consumption on myostatin and IGF-1, myocardial expression cases were divided into healthy donors, alcoholic donors, and donors with cardiac disease (either hypertensive or CMP).

The myostatin myocardial expression in healthy donors was  $5.768 \pm 0.522$ , being  $10.987 \pm 1.461$  in alcoholic donors and  $10.193 \pm 1.061$  in donors with cardiac disease. Alcoholic donors showed a non-significant increase in myostatin myocardial expression compared to control donors ( $P=0.075$ ). Similarly, donors with cardiac disease showed a non-significant increase with respect to healthy donors ( $P=0.053$ ). The IGF-1 myocardial expression in healthy

donors was  $3.720 \pm 1.203$ ,  $2.475 \pm 0.683$  in alcoholic donors and  $2.322 \pm 0.311$  in donors with cardiac disease. The IGF-1 myocardial expression of alcoholic donors was significantly lower compared to healthy donors ( $P=0.007$ ) (Fig. 2).

### Effect of cardiomyopathy

To evaluate the effect of the presence of CMP, defined as a LVEF lower than 50% on myostatin and IGF-1 myocardial expression, donors were divided into six subgroups according to the presence of CMP: 10 healthy donors, 10 hypertensive donors without CMP, 13 hypertensive donors with CMP, 12 donors with chronic alcohol consumption without CMP, 13 donors with chronic alcohol consumption with CMP and eight donors with other causes of CMP (three ischaemic disease, three valve disease and two idiopathic CMP).

Firstly donors without CMP (healthy donors, hypertensive donors without CMP and donors with chronic alcohol consumption without CMP) were compared with donors with CMP (hypertensive donors with CMP, donors with chronic alcohol consumption with CMP and donors with other causes of CMP). Donors with CMP showed a significant increase in myostatin myocardial expression compared to those without CMP ( $11.972 \pm 1.073$  vs.  $6.967 \pm 0.811$ ;  $P=0.002$ ). The IGF-1 myocardial expression in donors with CMP was  $2.317 \pm 0.373$ , being  $2.900 \pm 0.616$  in those without CMP, with no significant differences ( $P=0.835$ ) (Fig. 3).

Finally, we compared myostatin and IGF-1 myocardial expression in healthy donors used as controls with different sub-groups according to the presence of CMP (Table 3). We found a significant increase of myostatin expression in hypertensive donors with CMP compared to non-hypertensive healthy donors ( $9.976 \pm 2.045$  vs.  $5.768 \pm 0.522$ ;  $P=0.003$ ). We also found a significant increase in myostatin expression in alcoholic donors with CMP ( $14.091 \pm 2.402$ ), in donors with valve ( $14.830 \pm 1.270$ ) and idiopathic CMP ( $15.030 \pm 0.320$ ) compared to healthy controls ( $P=0.020$ ,  $0.012$  and  $0.044$ , respectively). The results are shown in Table 3.

**TABLE 1. Epidemiologic and clinical data of heart donors according to the presence of hypertension<sup>a</sup>**

	Non-hypertensive control donors (n = 33)	Donors with hypertension (n = 33)
Age [years, mean (SD)]	53.6 (14.7)	58.8 (10.9)
Male/female ratio (n)	21 : 12	24 : 9
Daily alcohol intake [g, mean (SD)]	50.4 (68.9)	34.1 (58.6)
Lifetime dose of ethanol [kg ethanol/kg body weight; mean (SD)]	4.9 (8.4)	1.5 (3.8)
Time from admission to donation [h, mean (SD)]	31 (4)	30 (3)
Active smokers [n (%)]	21 (64)	15 (45)
NYHA function [n (%)]	12 (36)	15(45)
Class I	11(33)	10 (31)
Class II	10 (31)	8 (24)
Cardiothoracic index [mean (SD)]	0.54 (0.07)	0.54 (0.04)
Left ventricular ejection fraction [%, mean (SD)] <sup>a</sup>	45 ± 9	46 ± 8
Left-ventricular end-systolic index (mm/m <sup>2</sup> ) (mean ± SD)	24 ± 6	23 ± 5
Left-ventricular end-diastolic index (mm/m <sup>2</sup> ) (mean ± SD)	32 ± 8	31 ± 7
Electrocardiogram [abnormal cases, n (%)]	8 (24)	11 (33)

CMP, cardiomyopathy; NYHA, New York Heart Association.

<sup>a</sup>Echocardiography was only performed in 27 donors who showed enlarged chest radiograph cardiothoracic index greater than 0.5. Eight donors with other causes of CMP had previous echocardiography data.



**TABLE 2. Comparison of histological findings in donors with and without arterial hypertension**

Myocardial histology	Non-hypertensive control donors (n = 33)	Donors with hypertension (n = 33)
Nuclear and/or cell hypertrophy [n (%)]	14 (42)	26 (79)*
Fibrosis [n (%)]	12 (36)	14 (42)
Necrosis [n (%)]	10 (30)	8 (24)

\* $P < 0.05$  compared with control donors.

No significant correlation was found between myostatin and IGF-1 ( $r = 0.183$ ,  $P = \text{NS}$ ) on comparing the expression of myostatin and IGF-1 in all the donors.

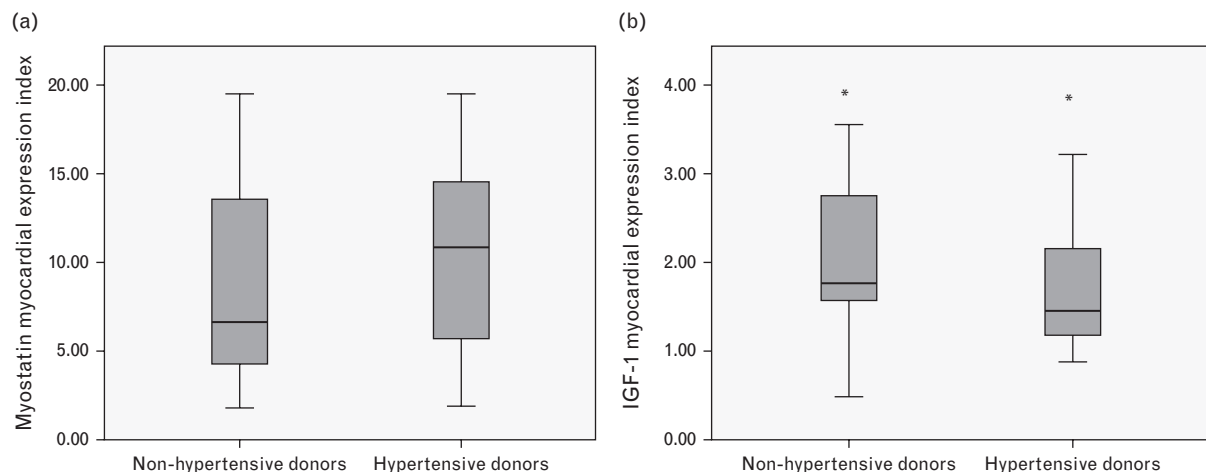
## DISCUSSION

Although the heart is one of the main target organs in AHT, little evidence is available to explain the diversity of pathogenic mechanisms implicated in heart damage in patients with the so-called HHD [1]. In AHT, the heart is submitted to clear haemodynamic factors that mechanically increase systolic ventricle wall stress and cardiac afterload [6]. In addition to these haemodynamic factors, recent experimental and clinical studies in AHT have suggested a relevant role of local hormonal and growth factors [7]. The sum of haemodynamic and non-haemodynamic factors probably contributes to the final heart damage developed in this setting. The heart is also a dynamic structure with clear adaptation mechanisms with relevant plasticity towards persistent stimuli, such as what a low-level chronic load causes in AHT patients [6,40]. At present, the main therapeutic approaches in AHT are addressed to decreasing the role of haemodynamic factors, with volume depletion and a decrease in arterial afterload, usually with no intervention related to non-haemodynamic aspects. Although simple deactivation of the hypertrophic pathways is unlikely, and certain hypertrophic signalling pathways may need to be basally active to prevent atrophy, it has been suggested that new targets of anti-remodelling therapy should be evaluated [6].

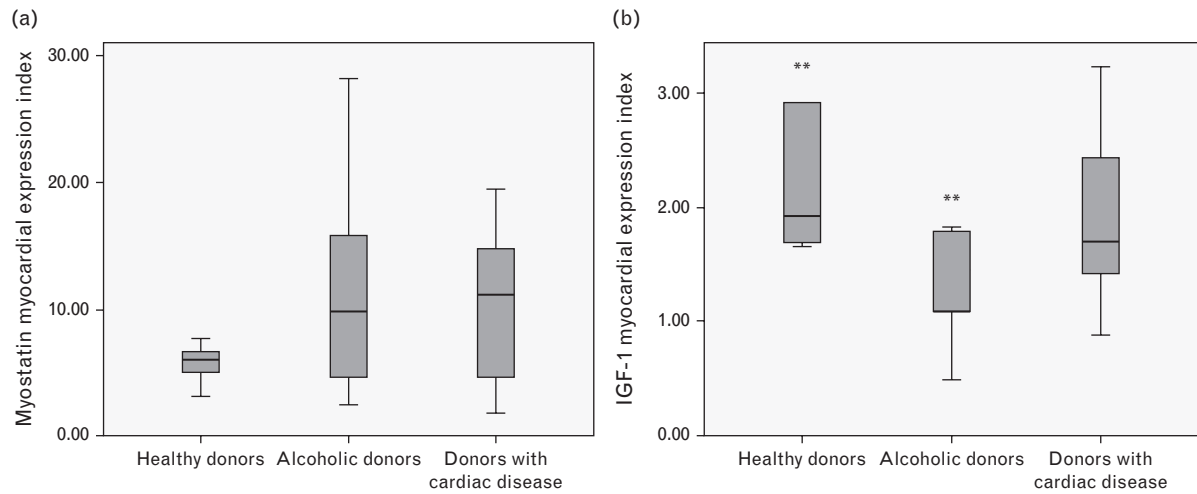
The present study focused on the potential role of some of these local neuro-hormonal pathways involved in

hypertension-induced cardiac damage, specifically the role of myostatin and IGF-1. This hypothesis is supported by previous experimental animal [41] and human studies [26] in which low levels of IGF-1 were found to be related to AHT. In a recent study by our group, we observed a non-significant downward trend of IGF-1 myocardial expression in AHT in human cardiac organ donors. Similarly, we have previously described the regulatory role of myostatin and IGF-1 in alcoholic CMP [13]. For the purpose of this study, myocardial samples were prospectively obtained from human heart donors and the effect of AHT on myostatin and IGF-1 myocardial expression was evaluated by immunohistochemistry. We also evaluated the influence of structural CMP in AHT donors in comparison to non-hypertensive donors and donors with other causes of cardiac damage.

As expected, the main results of the present study corroborate the higher myocyte cell and nuclear hypertrophy found in donors with hypertension as morphologic evidence of an overload effect of AHT on the cardiac myocytes. In the presence of hypertension, a significant decrease was observed in IGF-1 myocardial expression with a similar myostatin myocardial expression in comparison to healthy non-hypertensive control donors. Since myocardial IGF-1 activity counter-regulates myocyte protein synthesis, hypertrophy, differentiation and trophism [42,43], this decrease in IGF-1 myocardial expression in the presence of AHT may reflect a disturbance in a significant local regulation mechanism, with increased cardiac damage. It was of note that the local myocardial activity of IGF-1 is more relevant than that produced elsewhere (i.e. in the liver) and exogenous IGF-1 administration only has a



**FIGURE 1** Box plot comparing myostatin (a) and IGF-1 (b) myocardial expression according to the presence of hypertension. Myocardial expression index: percentage of positive cells to myostatin and IGF-1 with respect to negative cells by immunohistochemistry. \* $P < 0.05$ . IGF-1, insulin-like growth factor-1.



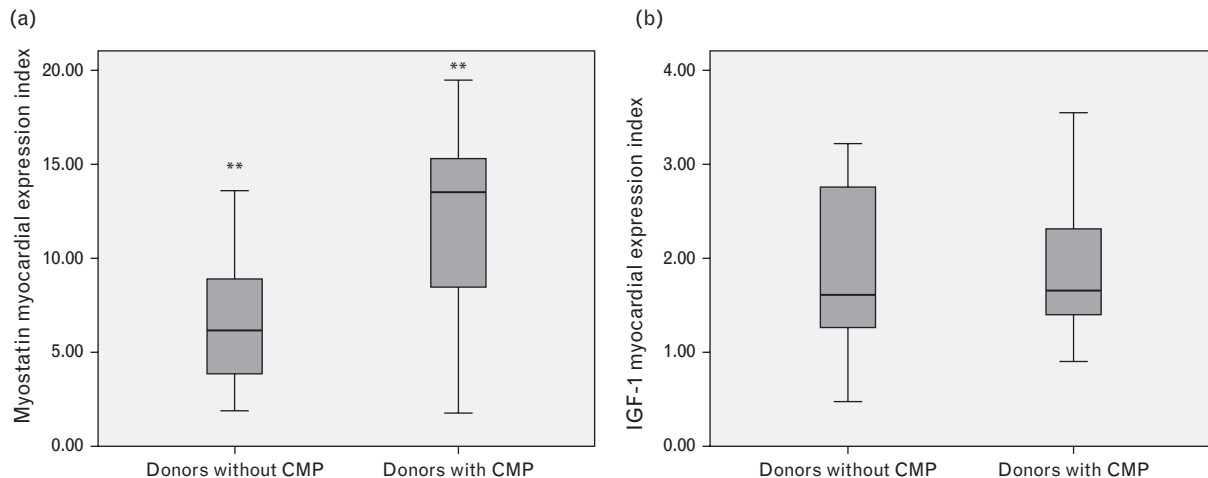
**FIGURE 2** Box plot comparing myostatin (a) and IGF-1 (b) myocardial expression in healthy donors, alcoholic donors and donors with cardiac disease. Myocardial expression index: percentage of positive cells to myostatin and IGF-1 with respect to negative cells by immunohistochemistry. **\*\*P < 0.01.** IGF-1, insulin-like growth factor-1.

transitory effect because of its rapid clearance [21]. A steady increase in local cardiac myocyte IGF-1 activity may counterbalance the cardiac damaging effect induced by the haemodynamic factors in AHT with the local protector effect of IGF-1. This situation in HHD is also similar to that reported by our group in previous studies on alcoholic dilated cardiomyopathy [29]. In experimental studies, IGF-1 has demonstrated a beneficial therapeutic effect on the myocardial dysfunction caused by excessive alcohol consumption [25]. On the contrary, myostatin myocardial activity does not play a relevant role in the presence of isolated AHT without structural CMP. One event corroborating this differential myocyte effect of IGF-1 and myostatin is the absence of a significant correlation between myostatin and IGF-1 myocardial activities in the whole sample of the organ donors evaluated in the present study.

The present study also corroborates the previously described effects of alcohol consumption on IGF-1 and myostatin myocardial expression [13,29]. Thus, donors with

alcohol consumption showed a non-significant increase in myostatin myocardial expression compared to control donors. In addition, the IGF-1 myocardial expression of alcoholic donors was significantly lower compared to healthy donors.

In the evaluation of the effect of the presence of structural CMP, we observed that IGF-1 myocardial expression did not increase in AHT donors with structural CMP in comparison to those without CMP. Interestingly, myocyte myostatin expression in AHT with CMP was significantly higher in comparison to non-hypertensive healthy donors. This fact is relevant and may be explained as an adaptive mechanism in response of hypertension-induced structural cardiac damage. This myostatin up-regulation may negatively influence the cardiac remodelling process since myostatin decreases myocyte proliferation and apoptosis [13]. In the present study, this increased myostatin myocardial expression was also corroborated in donors with CMP of diverse origin other than AHT (alcoholic, valve and



**FIGURE 3** Box plot comparing myostatin (a) and IGF-1 (b) myocardial expression according to the presence of cardiomyopathy (CMP). Myocardial expression index: percentage of positive cells to myostatin and IGF-1 with respect to negative cells by immunohistochemistry. **\*\*P < 0.01.** IGF-1, insulin-like growth factor-1.

**TABLE 3. Myostatin and insulin-like growth factor-1 expression in the different groups of donors according to the presence of cardiomyopathy**

Group	Myostatin		IGF-1	
	Mean	SD	Mean	SD
Healthy donors (n = 10)	5.768 <sup>b</sup>	0.522	4.389 <sup>b</sup>	1.267
Hypertensive donors without CMP (n = 10)	6.458 <sup>b,c</sup>	3.147	2.604 <sup>b</sup>	0.727
Hypertensive donors with CMP (n = 13)	9.976 <sup>c</sup>	2.045	3.090 <sup>b</sup>	0.854
Donors with chronic alcohol consumption without CMP (n = 12)	6.027 <sup>b</sup>	1.321	2.354 <sup>a</sup>	1.041
Donors with chronic alcohol consumption with CMP (n = 13)	14.091 <sup>c</sup>	2.402	2.733 <sup>b</sup>	0.766
Ischaemic CMP disease (n = 3)	2.150 <sup>a</sup>	0.280	2.145 <sup>b</sup>	0.395
Valve CMP disease (n = 3)	14.830 <sup>c</sup>	1.270	1.880 <sup>b</sup>	0.221
Idiopathic CMP (n = 2)	15.030 <sup>c</sup>	0.320	1.705 <sup>b</sup>	0.175

CMP, cardiomyopathy; IGF-1, insulin-like growth factor-1.  $P < 0.05$ . Superscript alphabet characters: 'a' significantly different from 'b' and 'c'; 'b' significantly different from 'a' and 'c'; 'c' significantly different from 'b' and 'a'.

coronary diseases). Thus, this myostatin myocyte up-regulation in the presence of structural CMP may be a common adaptive mechanism versus a persistent lesion mechanism to avoid excessive myocyte hypertrophy and unhealthy cardiac remodelling [13,44]. Thus, treatments able to inhibit myocardial myostatin activity may be potential regulatory mechanisms to modulate progressive heart damage in AHT [13,45–47]. However, this mechanism is not specific of AHT, since it has been corroborated in the present study and in other studies in other causes of progressive heart damage such as alcoholic dilated CMP [13].

Considering these two main findings derived from the present study, we could hypothesize that in patients with AHT, good IGF-1 local myocardial activity must be maintained in order to avoid progressive cardiac damage, since AHT decreases IGF-1 myocardial expression. Finally, when structural CMP develops, control of the unhealthy up-regulation of local myocyte myostatin could be an additional mechanism to avoid progressive heart damage, since increased myostatin activity impairs myocyte proliferation and limits cardiac repair mechanisms [13,24,44]. The consecutive combination of these two interventions, first increasing IGF-1 myocardial activity and later decreasing myostatin activity, may be a potentially useful scheme to limit progressive cardiac damage in AHT [15,16]. It has been suggested that these treatments targeting the hypertrophic process should be performed in other similar CMP [48,49]. However, it is likely that strategies for suppressing excessive activation of pathologic signalling pathways must be precisely regulated to avoid the disruption of homeostatic mechanisms [6].

The main limitation of the present study concerns the concrete role of these two pathogenic factors (myostatin and IGF-1) in a complex disease in which other factors probably also contribute to hypertension-induced heart damage [5]. Another limitation is that many donors had a moderate to high alcohol consumption, a fact that may influence either the development of AHT as well as cardiomyopathy. Evaluation of these myocardial effects of myostatin and IGF-1 is limited to the myocardial expression of these factors with immunohistochemical methods. Due to the difficulty in obtaining human myocardium samples, the present study was restricted to a relatively small number of middle-aged patients of Caucasian origin

with AHT, other causes of cardiac damage and controls included in the organ donor programme at our institution. Echography was limited to left ventricular systolic function donors with high cardiothoracic ratio. Diastolic function evaluation was not performed.

In conclusion, this study demonstrates that AHT down-regulates IGF-1 myocardial expression and that myostatin myocardial expression is significantly up-regulated in the presence of structural CMP of either hypertensive or other origin. These effects provide a potential therapeutic target and open the possibility to modulating hypertension-induced cardiac damage. Nonetheless, these results require translational assessment in specific clinical trials.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Funding: This work was supported by SGR-2013-1158 Generalitat de Catalunya, Spain and also by the research network CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Lip GYH, Felmeden DC, Li-Saw-Hee FL, Beevers DG. Hypertensive heart disease. A complex syndrome or a hypertensive 'cardiomyopathy'? *Eur Heart J* 2000; 21:1653–1665.
- Diamond JA, Phillips RA. Hypertensive heart disease. *Hypertens Res* 2005; 28:191–202.
- Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KL. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; 275:1557–1562.
- Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, et al. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation* 1998; 97:48–54.
- Díez J, Frohlich ED. A translational approach to hypertensive heart disease. *Hypertension* 2010; 55:1–8.
- Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 2008; 358:1370–1380.
- Diez J. Towards a new paradigm about hypertensive heart disease. *Med Clin N Am* 2009; 93:637–645.
- Deschepper CF, Boutin-Ganache I, Zahabi A, Jiang Z. In search of cardiovascular candidate genes: interactions between phenotypes and genotypes. *Hypertension* 2002; 39:332–336.
- Stefenelli T, Abela C, Frank H, Koller-Strametz J, Globits S, Bergler-Klein J, Niederle B. Cardiac abnormalities in patients with primary hyperparathyroidism: implications for follow-up. *J Clin Endocr Metab* 1997; 82:106–112.

10. Fazio S, Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Sabatini D, Colao A, *et al.* Impaired cardiac performance is a distinct feature of uncomplicated acromegaly. *J Clin Endocr Metab* 1994; 79:441–446.
11. Joulia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res* 2006; 312:2401–2414.
12. McKoy G, Bicknell KA, Patel K, Brooks G. Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res* 2007; 74:304–312.
13. Fernández-Solà J, Lluís M, Sacanella E, Estruch R, Antúnez E, Urbano-Márquez A. Increased myostatin activity and decreased myocyte proliferation in chronic alcoholic cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35:1–10.
14. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen J-W, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83:516–522.
15. Dean RG, Bach LA, Burrell LM. Upregulation of cardiac insulin-like growth factor-1 receptor by ACE inhibition after myocardial infarction: potential role in remodeling. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:831–839.
16. Delafontaine P. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1995; 30:825–834.
17. Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995; 16:143–163.
18. Ren J, Samson WK, Sowers JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:2049–2061.
19. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16:3–34.
20. Sell C, Baserga R, Rubin R. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995; 55:303–306.
21. Fan J, Char D, Kolasa AJ, Pan W, Maitra SR, Patlak CS, *et al.* Alterations in hepatic production and peripheral clearance of IGF-I after endotoxin. *Am J Physiol-Endoc M* 1995; 269:E33–E42.
22. Chu CH, Lo JF, Hu WS, Lu RB, Chang MH, Tsai FJ, *et al.* Histone acetylation is essential for ANG-II-induced IGF-IIR gene expression in H9c2 cardiomyoblast cells and pathologically hypertensive rat heart. *J Cell Physiol* 2012; 227:259–268.
23. Lee S-D, Chu C-H, Huang E-J, Lu M-C, Liu J-Y, Liu C-J, *et al.* Roles of insulin-like growth factor II in cardiomyoblast apoptosis and in hypertensive rat heart with abdominal aorta ligation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E306–E314.
24. Lang CH, Frost RA, Svanberg E, Vary TC. IGF-I/IGFBP-3 ameliorates alterations in protein synthesis, eIF4E availability, and myostatin in alcohol-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E916–E926.
25. Zhang B, Turdi S, Li Q, Lopez FL, Eason AR, Anversa P, Ren J. Cardiac overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction but not hypertrophy: Roles of Akt, mTOR, GSK3, and PTEN. *Free Radical Biol Med* 2010; 49:1238–1253.
26. Colao A, Di Somma C, Cascella T, Pivonello R, Vitale G, Grasso LFS, *et al.* Relationships between serum IGF1 levels, blood pressure, and glucose tolerance: an observational, exploratory study in 404 subjects. *Eur J Endocrinol* 2008; 159:389–397.
27. Andronico G, Mangano MT, Nardi E, Mulè G, Piazza G, Cerasola G. Insulin-like growth factor 1 and sodium-lithium countertransport in essential hypertension and in hypertensive left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 1993; 11:1097–1101.
28. Díez J, Laviades C, Martínez E, Gil MJ, Monreal I, Fernández J, Prieto J. Insulin-like growth factor binding proteins in arterial hypertension: relationship to left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 1995; 13:349–355.
29. Borrissier-Pairó F, Antunez E, Tobias E, Fernández-Solà J. Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption. *Regen Med Res* 2013; 1:3; doi:10.1186/2050-490X-1-3.
30. Vriz O, Piccolo D, Cozzutti E, Milani L, Gelisio R, Pegoraro F, *et al.* The effects of alcohol consumption on ambulatory blood pressure and target organs in subjects with borderline to mild hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11:230–234.
31. Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badía E, Sacanella E, *et al.* Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29:864–870.
32. Fernández-Solà J, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, Urbano-Márquez A, Nicolás J-M. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Hum Patbol* 2006; 37:1100–1110.
33. Ector H, Lancellotti P, Roberts WC, Wenger NK, Moss AJ, Smith ER, *et al.* A statement on ethics from the HEART group. *JACC Cardiovasc Imaging* 2008; 1:410–412.
34. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, *et al.* 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013; 31:1281–1357.
35. de Vries J, Lemmens P, Pietinen P, Kok F. Assessment of alcohol consumption. In: MacDonald I, editor. *Health issues related to alcohol consumption. Volume 2*, 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Science; 1999. pp. 28–62.
36. Fernandez-Solà J, Estruch R, Grau JM, Pare JC, Rubin E, Urbano-Márquez A. The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1994; 120:529–536.
37. Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-Lopez F, Grau JM, Mont L, Rubin E. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 1989; 320:409–415.
38. Goldman L, Hashimoto B, Cook E, Loscalzo A. Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation* 1981; 64:1227–1234.
39. Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, Manning WJ, *et al.* American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials: a report from the american society of echocardiography's guidelines and standards committee and the task force on echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17:1086–1119.
40. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:551–571.
41. Jin X, Xia L, Wang L, Shi J, Zheng Y, Chen W, *et al.* Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Proteomics* 2006; 6:2326–12326.
42. Niemelä O, Parkkila S, Worrall S, Emery PW, Preedy VR. Generation of aldehyde-derived protein modifications in ethanol-exposed heart. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27:1987–1992.
43. Ren J, Wold LE. Mechanisms of alcoholic heart disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; 2:497–506.
44. Shyu K-G, Ko W-H, Yang W-S, Wang B-W, Kuan P. Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005; 68:405–414.
45. González A, Fortuño MaA, Querejeta R, Ravassa S, López B, López N, Díez J. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003; 59:549–562.
46. Wagner KR, Liu X, Chang X, Allen RE. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2519–2524.
47. Yang W, Zhang Y, Ma G, Zhao X, Chen Y, Zhu D. Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326:660–666.
48. Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol-Heart C* 2005; 289:H8–H16.
49. Fazio S, Palmieri EA, Affuso F, Cittadini A, Castellano G, Russo T, *et al.* Effects of growth hormone on exercise capacity and cardiopulmonary performance in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocr Metab* 2007; 92:4218–4223.

## Reviewers' Summary Evaluations

### Referee 1

Myocardial expression of myostatin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were evaluated in 66 heart donors, to investigate their role in the development of hypertensive-induced cardiac damage. Donors with hypertension ( $n=33$ ) showed similar myostatin myocardial expression as controls but lower IGF-1 myocardial expression. Myostatin expression was significantly higher in the presence of structural cardiomyopathy (CMP, defined as LV ejection fraction  $<50\%$  and LV enlargement). Despite the limitation represented by the confounding factor related to alcohol consumption, the paper indicates a potential role of myostatin and IGF-1 in the progression of cardiac disease

### Referee 2

The strength of this study is the demonstration of factors that contribute to the myocardial changes induced by hypertension. The use of tissue from donor hearts is unique and increases the validity of the results and also the prospect for further studies and the possibility for later treatment and intervention strategies. The weakness of the study is that the specific role of the two described mechanisms and their interactions among the other neuro-hormonal activities in the development of hypertension-induced myocardial changes still has to be determined. A further weakness is the fact that donors were recruited from a hospital alcohol unit and had consumed a variable amount of alcohol which could represent a potential confounding factor.



#### IV.2.1 Resum dels principals resultats obtinguts en l'estudi d'hipertensió

En aquesta fase de l'estudi es van incloure un total de 66 mostres de cor obtingudes a través de la Unitat de Transplantament de l'Hospital Clínic entre el gener de 2006 al desembre de 2008.

Es van classificar inicialment 2 grups de donants: donants sense hipertensió arterial i donants amb hipertensió arterial. Les característiques clíniques dels diferents grups de donants es descriuen a la **Taula 6**.

**Taula 6. Dades clíniques, epidemiològiques i troballes histològiques dels diferents grups de donants segons la presència d'hipertensió arterial**

	Donants no hipertensos (n=33)	Donants amb hipertensió arterial (n=33)
Edat (y; mitjana (SD))	53,6 (14,7)	58,8 (10,9)
Ratio home/dona (n)	21:12	24:9
Ingesta diària d'alcohol (g; mitjana (SD))	50,4 (68,9)	34,1 (58,6)
Dosi acumulada d'etanol (kg etanol/kg pes; mitjana (SD))	4,9 (8,4)	1,5 (3,8)
Fumadors actius [n (%)]	21 (64)	15 (45)
Temps des de l'admissió a la donació (h; mitjana (SD))	31 (4)	30 (3)
Funció NYHA [n (%)]		
Classe I	12 (36)	15(45)
Classe II	11(33)	10 (31)
Classes III i IV	10 (31)	8 (24)
Índex cardioràdic (mitjana (SD))	0,54 (0,07)	0,54 (0,04)
Fracció d'ejecció ventricle esquerre (%;mitjana (SD))	45 (9)	46 (8)
Electrocardiograma [casos anormals; n (%)]	8 (24)	11 (33)
Histologia Miocardiaca		
Hipertròfia nuclear i/o cel·lular [n (%)]	14 (42)	26 (79)*
Fibrosi [n (%)]	12 (36)	14 (42)
Necrosi [n (%)]	10 (30)	8 (24)

NYHA: New York Heart Association.

SD: desviació estàndard

Un electrocardiograma anormal es caracteritza per la presència d'alteracions del ritme, defectes de conducció, signes d'hipertròfia ventricular esquerra o repolarització anormal.

\* p < 0.05 comparat amb els donants control.

No es van observar diferències entre els diferents grups pel que fa a les dades clíniques i epidemiològiques. Es va detectar diferència en la presència d'hipertròfia nuclear i/o cel·lular, essent els donants amb hipertensió arterial els que en presentaven en major grau.

A la **Taula 7** es detallen els resultats de l'expressió miocardiàca de miostatina i d'IGF-1 per cada grup de donants. S'observa que els donants amb presència de miocardiopatia presenten un augment en l'expressió miocardiàca de miostatina respecte els que no en tenen. En el cas de l'expressió miocardiàca d'IGF-1 l'única diferència significativa que s'observa és en el cas de donants amb consum excessiu d'alcohol sense miocardiopatia, que la presenten disminuïda.

**Taula 7. Comparació dels estudis immunohistoquímics en l'expressió de miostatina i d'IGF-1 entre els diferents grups de donants**

Grup de donants	Índex d'expressió miocardiàca de miostatina		Índex d'expressió miocardiàca d'IGF-1	
	Mitjana	SD	Mitjana	SD
Sans (n=10)	5,768 <sup>b</sup>	0,522	4,389 <sup>b</sup>	1,267
Hipertensos sense MCP (n=10)	6,458 <sup>bc</sup>	3,147	2,604 <sup>b</sup>	0,727
Hipertensos amb MCP (n=13)	9,976 <sup>c</sup>	2,045	3,090 <sup>b</sup>	0,854
Amb consum excessiu d'alcohol sense MCP (n=12)	6,027 <sup>b</sup>	1,321	2,354 <sup>a</sup>	1,041
Amb consum excessiu d'alcohol amb MCP (n=13)	14,091 <sup>c</sup>	2,402	2,733 <sup>b</sup>	0,766
MCP isquèmica (n=3)	2,150 <sup>a</sup>	0,280	2,145 <sup>b</sup>	0,395
MCP vascular (n=3)	14,830 <sup>c</sup>	1,270	1,880 <sup>b</sup>	0,221
MCP idiopàtica (n=2)	15,030 <sup>c</sup>	0,320	1,705 <sup>b</sup>	0,175

IGF-1: *insuline-like growth factor-1*; MCP: miocardiopatia

Els superíndexs indiquen diferències significatives entre lletres (p<0,05)

En presència d'hipertensió arterial, l'expressió miocardiàca d'IGF-1 es troba disminuïda, mentre que l'expressió miocardiàca de miostatina no es veu alterada (**Figura 14**). Per altra banda, en classificar els donants en funció de la presència o no de miocardiopatia, sigui hipertensiva o alcohòlica, s'observa un augment en l'expressió miocardiàca de miostatina (**Figura 15**).



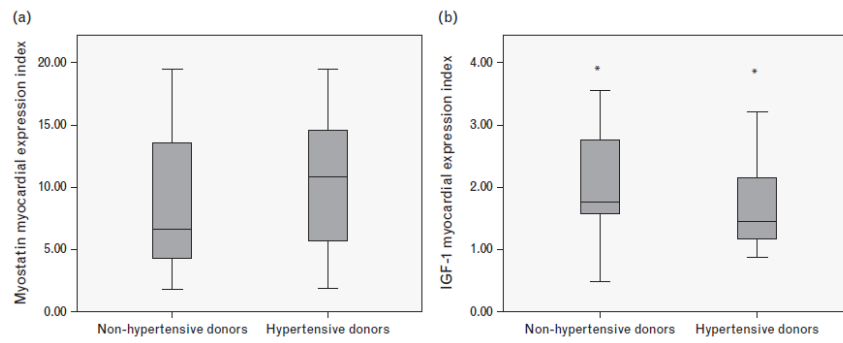


FIGURE 1 Box plot comparing myostatin (a) and IGF-1 (b) myocardial expression according to the presence of hypertension. Myocardial expression index: percentage of positive cells to myostatin and IGF-1 with respect to negative cells by immunohistochemistry. \* $P < 0.05$ . IGF-1, insulin-like growth factor-1.

**Figura 14. Comparació d'expressió miocardiàca de miostatina i d'IGF-1 entre els donants no hipertensos i donants amb hipertensió arterial (\* $p < 0.05$ )**

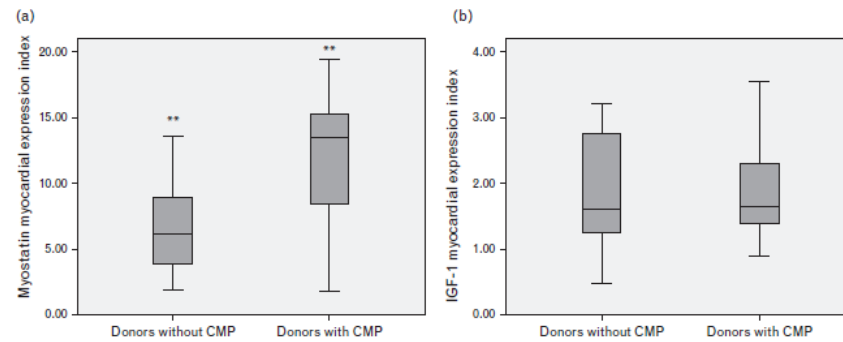


FIGURE 3 Box plot comparing myostatin (a) and IGF-1 (b) myocardial expression according to the presence of cardiomyopathy (CMP). Myocardial expression index: percentage of positive cells to myostatin and IGF-1 with respect to negative cells by immunohistochemistry. \*\* $P < 0.01$ . IGF-1, insulin-like growth factor-1.

**Figura 15. Comparació d'expressió miocardiàca de miostatina i d'IGF-1 entre els donants amb i sense miocardiopatia (\*\* $p < 0.01$ )**





## Capítol V

### **Discussió general**

---



### **V.1 Discussió de la relació entre alcohol i expressió d'IGF-1**

En aquest estudi s'ha volgut avaluar l'efecte que el consum crònic excessiu d'alcohol pot causar sobre l'expressió miocardiaca de l'IGF-1 comparant-la amb donants sans, donants amb hipertensió o donants amb presència d'altres miocardiopaties mitjançant tècniques immunohistoquímiques.

Els resultats de l'estudi demostren que el consum excessiu d'alcohol disminueix significativament l'expressió miocardiaca de IGF-1 respecte els donants control (sans sense consum d'alcohol). Per altra banda, no s'han observat diferències significatives en l'expressió miocardiaca d'IGF-1 entre els altres grups, tot i que si que s'ha pogut observar una tendència a la baixa en l'activitat miocardiaca d'IGF-1 en els donants amb hipertensió sense consum d'alcohol.

És destacable el fet que l'expressió miocardiaca d'IGF-1 es trobi disminuïda en aquells donants amb hipertròfia dels miòcits. Aquesta disminució es pot deure a la regulació negativa que hi ha entre la hipertròfia cel·lular i l'expressió IGF-1, corroborant així la influència que té aquest factor de creixement sobre la hipertrofia del miocardi. Tenint en compte els donants amb consum crònic excessiu d'alcohol, aquells que no presenten miocardiopatia tenen uns nivells d'expressió miocardiaca d'IGF-1 significativament inferiors als dels controls, mentre que aquells amb miocardiopatia només mostren una tendència a la baixa respecte els controls. Això es pot explicar per un efecte compensatori que podria tenir la

presència de miocardiopatia sobre l'expressió d'IGF-1. De totes maneres i com ja s'ha dit, en agrupar tots els donants amb consum excessiu d'alcohol sense tenir en compte la presència de miocardiopatia, els valors d'expressió miocardiaca d'IGF-1 són més baixos que als controls.

L'IGF-1 és un factor que té un rol important en la proliferació i la diferenciació dels diferents tipus cel·lulars, incloent els miòcits. A més, incrementa la síntesis cardíaca de DNA i proteïnes i redueix la degradació de proteïnes (Ren, *et al.*, 1999). Després d'un infart de miocardi, l'IGF-1 millora la funció cardíaca estimulant la contractilitat i promovent el remodelat del teixit. Per tant, una disminució d'IGF-1, com podria ser en el cas del consum crònic excessiu d'alcohol, tindria efectes sobre la funció miocardiaca i la regeneració dels miòcits (Leroith, *et al.*, 1995, Ren, *et al.*, 1999). La utilització d'IGF-1 en pacients amb consum excessiu d'alcohol pot tenir un important efecte terapèutic per tal d'evitar el desenvolupament de miocardiopatia.

La disminució en la síntesi proteica i la iniciació de la traducció que l'alcohol indueix sobre el miocardi podria ser el mecanisme que explicaria la disminució en l'expressió miocardiaca d'IGF-1 induïda per l'alcohol (Niemelä, *et al.*, 2003). Aquest mecanisme produeix una deficiència en la disponibilitat i l'efectivitat de diferents tipus d'hormones, com l'IGF-1 (Lang, *et al.*, 2001) i la miostatina (Fernández-Solà, *et al.*, 2011). Els resultats d'aquest estudi concorden amb els que s'han observat en estudis experimentals on rates sotmeses a consum d'alcohol van mostrar una

reducció en el contingut de mRNA d'IGF-1 en fetge i múscul esquelètic respecte les rates control (Lang, *et al.*, 2004). En aquest sentit, s'ha suggerit que l'IGF-1 protegeix el miocardi reduint l'apoptosi i incrementant la proliferació dels miòcits (Ren, *et al.*, 1999). Per aquest motiu, la disminució de l'expressió miocardiaca d'IGF-1 induïda per l'alcohol pot trobar-se compensada parcialment en presència de dany cardíac, com ja s'ha mencionat.

Els donants amb consum crònic excessiu d'alcohol del present estudi eren també alts consumidors de tabac, pel que es podria pensar que el tabac podria ser també un causant de la disminució en l'expressió d'IGF-1, però en l'anàlisi multivariant que s'ha fet no s'ha identificat el tabac com a una variable que influís sobre aquest factor. A més, estudis previs ja han demostrat que no hi ha un efecte biològic del tabac sobre l'activitat IGF-1 (Palmer, *et al.*, 2003, Chełchowska, *et al.*, 2010).

Tot i que es creu que existeix una correlació directe entre el consum d'alcohol i l'expressió miocardiaca d'IGF-1, en aquest estudi no s'ha pogut demostrar, segurament degut a la manca de donants amb nivells molt elevats de consum d'alcohol. A més, l'alcohol té altres efectes patogènics sobre el miocardi i l'efecte nociu global es pot deure a la suma de diversos mecanismes implicats com l'alteració dels canals de calci, la inducció de l'apoptosi, l'increment en l'expressió de miostatina o la inducció de dany

oxidatiu (Fatjó, *et al.*, 2005, Fernández-Solà, *et al.*, 2006, Fernández-Solà, *et al.*, 2011).

Pel que fa als donants amb hipertensió sense consum d'alcohol van mostrar una tendència a la baixa en l'expressió miocardiàca d'IGF-1 respecte els controls. Això concorda amb estudis previs on s'han associat nivells baixos d'IGF-1 amb la hipertensió en pacients sense altres malalties cardiovasculars (Colao, *et al.*, 2008).

## **V.2 Discussió de la relació entre hipertensió i IGF-1 i Miostatina**

Tot i que el cor és un dels principals òrgans afectats per la hipertensió, hi ha pocs estudis que puguin explicar la diversitat dels mecanismes patogènics implicats en el dany cardíac en pacients amb miocardiopatia hipertensiva (Lip, *et al.*, 2000). En pacients amb hipertensió arterial, el cor està afectat per factors hemodinàmics que mecànicament incrementen l'estrès de les parets del ventricle i la postcàrrega cardíaca (Hill i Olson, 2008). A banda d'aquests factors hemodinàmics, estudis previs sobre la hipertensió arterial han suggerit la rellevància d'hormones i factors de creixement locals (Díez, 2009). La suma dels factors hemodinàmics i no hemodinàmics contribueixen al desenvolupament del dany cardíac en últim terme. El cor també és una estructura dinàmica amb mecanismes adaptatius i amb certa plasticitat per tal de compensar els estímuls externs com pot ser el baix nivell de càrrega en pacients amb hipertensió arterial (Sadoshima i Izumo, 1997, Hill i Olson,



2008). Les actuacions terapèutiques en casos d'hipertensió arterial es centren principalment en els factors hemodinàmics sense tenir gaire en compte els factors no hemodinàmics. En aquest sentit s'han d'estudiar noves dianes terapèutiques per al tractament de la hipertensió (Hill i Olson, 2008).

El present estudi s'ha enfocat en analitzar el possible rol que tenen la miostatina i l'IGF-1 en el dany cardíac causat per la hipertensió arterial. Estudis anteriors en animals (Jin, *et al.*, 2006) i en humans (Colao, *et al.*, 2008) han confirmat nivells baixos d'IGF-1 en presència d'hipertensió arterial. De manera similar hem descrit anteriorment la regulació que fan la miostatina i l'IGF-1 en miocardiopaties (Fernández-Solà, *et al.*, 2011). En el present estudi s'ha estudiat, mitjançant tècniques immunohistoquímiques en mostres de cor de donants, la relació que hi ha entre la presència d'hipertensió arterial i l'expressió miocardiaca de miostatina i IGF-1. Per altra banda també s'ha estudiat la influència de presència de miocardiopatia en donants hipertensos i no hipertensos i donants amb altres causes de dany cardíac.

Com era d'esperar, els resultats de l'estudi mostren que els donants amb presència d'hipertensió arterial presenten hipertròfia cel·lular i nuclear. Això és una conseqüència de l'efecte de sobrecàrrega de que la hipertensió arterial produeix als cardiòcits. En presència d'hipertensió arterial, es va observar una disminució significativa en l'expressió miocardiaca d'IGF-1

respecte els donants sans no hipertensos. Mentre que l'activitat miocardiàca de l'IGF-1 contra-regula la síntesis de proteïnes, la hipertròfia, la diferenciació i el tropisme del miòcit (Niemelä, *et al.*, 2003, Ren i Wold, 2008), la disminució de la seva activitat en presència d'hipertensió arterial pot suposar una alteració en aquest mecanisme de regulació incrementant el dany cardíac. És important remarcar que l'activitat miocardiàca local de l'IGF-1 és més important que en d'altres òrgans (p.e. en el fetge) i que l'administració exògena d'IGF-2 té un efecte només transitori degut al seu ràpid aclariment (Fan, *et al.*, 1995).

Un increment local de l'activitat IGF-1 en els cardiòcits pot compensar el dany cardíac ocasionat per factors hemodinàmics de la hipertensió arterial. Estudis experimentals han demostrat l'efecte terapèutic de l'IGF-1 en la disfunció cardíaca causada per un consum excessiu d'alcohol (Zhang, *et al.*, 2010). Per altra banda, l'activitat miocardiàca de la miostatina no té un rol important en cas d'hipertensió arterial sense presència de miocardiopatia. L'absència de correlació entre l'activitat miocardiàca de l'IGF-1 i la miostatina en aquest estudi corrobora aquest efecte diferencial de l'IGF-1 i la miostatina.

El present estudi també corrobora el descrit en estudis anteriors que han objectivat l'efecte del consum d'alcohol sobre l'expressió miocardiàca de miostatina (Fernández-Solà, *et al.*, 2011). Així doncs, donants amb consum

d'alcohol han mostrat un increment no significatiu de l'expressió miocardiàca de miostatina respecte els donants sense consum d'alcohol.

Durant l'avaluació de l'efecte de la presència de miocardiopatia estructural, es va observar que l'expressió miocardiàca d'IGF-1 no incrementava en donants amb hipertensió arterial amb miocardiopatia quan es comparava amb donants amb hipertensió arterial sense miocardiopatia. Pel que fa a la miostatina, la seva expressió miocardiàca en donants amb hipertensió arterial i miocardiopatia va ser significativament més elevada en comparació amb donants no hipertensos sans. Aquesta regulació de la miostatina pot afectar negativament el procés de remodelació cardíaca ja que la miostatina inhibeix la proliferació i l'apoptosi dels miòcits (Fernández-Solà, *et al.*, 2011). L'increment en l'expressió miocardiàca de la miostatina va ser corroborada també en donants amb miocardiopatia d'altres orígens no relacionats amb la hipertensió (alcohòlica, malalties valvulars o coronàries). Per tant, aquest increment en la miostatina del miòcit en presència de miocardiopatia podria ser un mecanisme adaptatiu per contrarestar una lesió persistent que podria provocar una excessiva hipertròfia del miòcit i una mal remodelat cardíac (Shyu, *et al.*, 2005, Fernández-Solà, *et al.*, 2011). En aquest sentit, tractaments que inhibeixin l'activitat de la miostatina podrien utilitzar-se per tal de regular i modular el dany cardíac en pacients amb hipertensió arterial (González, *et al.*, 2003, Wagner, *et al.*, 2005, Yang, *et al.*, 2005, Fernández-Solà, *et al.*, 2011). No obstant, aquest mecanisme no és específic d'hipertensió arterial, tal com s'ha vist i corroborat en aquest i d'altres

estudis sobre altres causes de lesió cardíaca progressiva com pot ser la miocardiopatia dilatada deguda a un consum excessiu d'alcohol (Fernández-Solà, *et al.*, 2011).

Tenint en compte les troballes del present estudi, podem pensar que en pacients amb hipertensió arterial s'ha de mantenir una bona activitat miocardiaca d'IGF-1 per tal d'evitar un dany progressiu, ja que l'hipertensió arterial en disminueix la seva expressió. Finalment, quan es desenvolupa miocardiopatia, controlar la regulació de la miostatina en el miòcit pot ser un mecanisme addicional per evitar també un major dany cardíac, ja que la miostatina altera la proliferació del miòcit i limita els mecanismes de reparació cardíaca (Lang, *et al.*, 2004, Shyu, *et al.*, 2005, Fernández-Solà, *et al.*, 2011). La combinació d'aquests tractaments, primer incrementar l'activitat miocardiaca d'IGF-1 i posteriorment disminuir l'activitat de la miostatina, pot ser útil per limitar el progressiu dany cardíac en hipertensió arterial (Delafontaine, 1995, Dean, *et al.*, 2003). S'ha suggerit que aquests tractaments enfocats en el procés d'hipertròfia es podrien aplicar també en altres miocardiopaties (Berenji, *et al.*, 2005, Fazio, *et al.*, 2007). De totes maneres, és probable que les estratègies per suprimir l'excessiva activació de les vies de senyalització cel·lular s'hagin de regular acuradament a cada cas en concret, per evitar desordres en els mecanismes homeostàtics (Hill i Olson, 2008).

### V.3 Limitacions de l'estudi

Una de les limitacions d'aquest estudi és que l'avaluació de l'expressió miocardiaca d'IGF-1 i miostatina es va fer en grups de donants, sense considerar altres mecanismes patològics que poden estar implicats en el dany cardíac produït per hipertensió arterial o consum excessiu d'alcohol. Aquest estudi no inclou dades de la cascada de la miostatina o de l'IGF-1, ni s'inclouen estudis *in vitro*. El grau de consum diari i acumulat d'alcohol dels donats era moderat, per tant no es van considerar l'efecte d'altres dosis d'alcohol. L'expressió d'IGF-1 estava limitada a immunohistoquímica sense tenir en compte el senyal intracel·lular o del receptor.

Una altra limitació té a veure amb el rol que desenvolupen la miostatina i l'IGF-1 en malalties complexes on també hi poden participar d'altres factors (Díez i Frohlich, 2010). L'avaluació dels efectes miocardiacs de la miostatina i l'IGF-1 estan limitats a l'expressió miocardiaca d'aquests factors mitjançant tècniques immunohistoquímiques. Degut a la dificultat per obtenir mostres de miocardi, l'estudi s'ha concretat en donants del programa de donació de la nostra institució i va consistir en pacients de mitjana edat d'origen caucàsic amb hipertensió arterial, consum crònic excessiu d'alcohol i altres causes de dany cardíac a més de donants sans.





## Capítol VI

# Conclusions generals

---

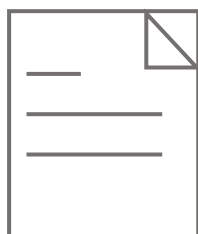




Els resultats dels estudis inclosos en aquesta tesi ens donen una idea de quin és l'efecte de la hipertensió arterial i el consum excessiu d'alcohol sobre l'expressió miocardiaca d'IGF-1 i miostatina i la seva relació amb el desenvolupament de miocardiopatia. Tenint en compte els objectius de la tesi i els resultats obtinguts podem concloure que:

1. Els individus afectats d'hipertensió arterial presenten una disminució en l'expressió miocardiaca d'IGF-1.
2. Els individus afectats de miocardiopatia, sigui hipertensiva o alcohòlica, presenten un augment en l'expressió miocardiaca de miostatina.
3. El consum excessiu d'alcohol en pacients que no presenten dany miocardiàc disminueix l'expressió d'IGF-1. Aquesta disminució d'IGF-1 induïda per l'alcohol es compensa parcialment en presència de dany miocardiàc.
4. No s'ha observat correlació entre el consum d'alcohol i l'expressió miocardiaca d'IGF-1.
5. La utilització d'IGF-1 en pacients amb consum excessiu d'alcohol pot tenir un important efecte terapèutic per tal d'evitar el desenvolupament de miocardiopatia. Aquests resultats obren la porta a un objectiu terapèutic amb IGF-1 i miostatina per tal de controlar el dany cardíac causat per la hipertensió.





## Capítol VII

# **Bibliografia**

---



- Ahuja, P., Sdek, P. i MacLellan, W. R. (2007). **Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration.** *Physiological Reviews*. 87(2): 521-544.
- Banegas, J. R., Navarro-Vidal, B., Ruilope, L. M., Cruz, J. J. d. I., López-García, E., Rodríguez-Artalejo, F. i Graciani, A. (2015). **Trends in Hypertension Control Among the Older Population of Spain From 2000 to 2001 to 2008 to 2010.** *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 8(1): 67-76.
- Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A. i Hill, J. A. (2005). **Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?** *Am J Physiol-Heart C*. 289(1): H8-H16.
- Buja, L. M. i Vela, D. (2008). **Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart.** *Cardiovascular Pathology*. 17(6): 349-374.
- Catalá-López, F., Sanfélix-Gimeno, G., García-Torres, C., Ridao, M. i Peiró, S. (2012). **Control of arterial hypertension in Spain: a systematic review and meta-analysis of 76 epidemiological studies on 341 632 participants.** *Journal of hypertension*. 30(1): 168-176.
- Chetchowska, M., Gajewska, J., Ambroszkiewicz, J., Blumska-Janiak, M., Maciejewski, T. i Laskowska-Klita, T. (2010). **The effect of tobacco smoking on serum concentration of IGF-I and its binding proteins IGFBP-3 and IGFBP-4 in pregnant women.** *Przeql Lek*. 67(10): 893-6.
- Chiva-Blanch, G., Arranz, S., Lamuela-Raventos, R. M. i Estruch, R. (2013). **Effects of Wine, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease Risk Factors: Evidences from Human Studies.** *Alcohol and Alcoholism*. 48(3): 270-277.
- Colao, A., Di Somma, C., Cascella, T., Pivonello, R., Vitale, G., Grasso, L. F. S., Lombardi, G. i Savastano, S. (2008). **Relationships between serum IGF1 levels, blood pressure, and glucose tolerance: an observational, exploratory study in 404 subjects.** *Eur J Endocrinol*. 159(4): 389-397.
- Coll de Tuero, G., Dalfó i Baqué, A., de la Figuera Von Wichmann, M., Gibert i Llorach, E., Isnard Blanchar, M., Martínez Alonso, V., Pepio Vilaubi, J., Roca-Cusachs Coll, A., Salleras Marcó, N. i de la Sierra Iserte, A., 2012. **Hipertensió arterial. Guies de pràctica clínica i material docent, núm. 6. Barcelona. Institut Català de la Salut.** Disponible a [http://ics.gencat.cat/web/.content/documents/assistencia/gpc/guia\\_hta.pdf](http://ics.gencat.cat/web/.content/documents/assistencia/gpc/guia_hta.pdf).

- de la Sierra, A., Gorostidi, M., Marín, R., Redón, J., Banegas, J. R., Armario, P., García Puig, J., Zarco, J., Llisterri, J. L., Sanchís, C., *et al.* (2008). **Evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial en España. Documento de consenso.** Medicina Clínica. 131(3): 104-116.
- de Vries, J., Lemmens, P., Pietinen, P. i Kok, F., 1999. **Assessment of alcohol consumption.** In: Health issues related to Alcohol Consumption (2nd Ed). Blackwell Science, Oxford, United Kingdom, pp: 28-62.
- Dean, R. G., Bach, L. A. i Burrell, L. M. (2003). **Upregulation of cardiac insulin-like growth factor-I receptor by ACE inhibition after myocardial infarction: potential role in remodeling.** J Histochem Cytochem. 51(6): 831-839.
- Delafontaine, P. (1995). **Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system.** Cardiovasc Res. 30(6): 825-834.
- Di Castelnuovo, A., Costanzo, S., Bagnardi, V., Donati, M., Iacoviello, L. i de Gaetano, G. (2006). **Alcohol dosing and total mortality in men and women: An updated meta-analysis of 34 prospective studies.** Archives of Internal Medicine. 166(22): 2437-2445.
- Diamond, J. A. i Phillips, R. A. (2005). **Hypertensive heart disease.** Hypertens Res. 28(3): 191-202.
- Díez, J. (2009). **Towards a new paradigm about hypertensive heart disease.** Med Clin N Am. 93(3): 637-645.
- Díez, J. i Frohlich, E. D. (2010). **A translational approach to hypertensive heart disease.** Hypertension. 55(1): 1-8.
- Fan, J., Char, D., Kolasa, A. J., Pan, W., Maitra, S. R., Patlak, C. S., Spolarics, Z., Gelato, M. C. i Lang, C. H. (1995). **Alterations in hepatic production and peripheral clearance of IGF-I after endotoxin.** Am J Physiol-Endoc M. 269(1): E33-E42.
- Fatjó, F., Fernández-Solà, J., Lluís, M., Elena, M., Badía, E., Sacanella, E., Estruch, R. i Nicolás, J.-M. (2005). **Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism.** Alcohol Clin Exp Res. 29(5): 864-870.
- Fatjó, F., Sancho-Bru, P., Fernández-Solà, J., Sacanella, E., Estruch, R., Bataller, R. i Nicolás, J.-M. (2007). **Up-regulation of myocardial L-type Ca<sup>2+</sup> channel in chronic alcoholic subjects without cardiomyopathy.** Alcohol Clin Exp Res. 31(7): 1099-1105.

- Fazio, S., Palmieri, E. A., Affuso, F., Cittadini, A., Castellano, G., Russo, T., Ruvolo, A., Napoli, R. i Saccà, L. (2007). **Effects of growth hormone on exercise capacity and cardiopulmonary performance in patients with chronic heart failure.** J Clin Endocr Metab. 92(11): 4218-4223.
- Fernández-Solà, J. (2015). **Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption.** Nat Rev Cardiol. 12(10): 576-587.
- Fernández-Solà, J., Estruch, R., Grau, J. M., Pare, J. C., Rubin, E. i Urbano-Márquez, A. (1994). **The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy.** Ann Intern Med. 120(7): 529-536.
- Fernández-Solà, J., Estruch, R. i Urbano-Márquez, A. (1997). **Alcohol and heart muscle disease.** Addict Biol. 2(1): 9-17.
- Fernández-Solà, J., Fatjó, F., Sacanella, E., Estruch, R., Bosch, X., Urbano-Márquez, A. i Nicolás, J.-M. (2006). **Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy.** Hum Pathol. 37(8): 1100-1110.
- Fernández-Solà, J., Lluís, M., Sacanella, E., Estruch, R., Antúnez, E. i Urbano-Márquez, A. (2011). **Increased myostatin activity and decreased myocyte proliferation in chronic alcoholic cardiomyopathy.** Alcohol Clin Exp Res. 35(7): 1-10.
- Goldman, L., Hashimoto, B., Cook, E. i Loscalzo, A. (1981). **Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale.** Circulation. 64(6): 1227-1234.
- González, A., Fortuño, M. a. A., Querejeta, R., Ravassa, S., López, B., López, N. i Díez, J. (2003). **Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy.** Cardiovasc Res. 59(3): 549-562.
- Gottdiener, J. S., Bednarz, J., Devereux, R., Gardin, J., Klein, A., Manning, W. J., Morehead, A., Kitzman, D., Oh, J., Quinones, M., Schiller, N. B., Stein, J. H. i Weissman, N. J. (2004). **American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials: A report from the american society of echocardiography's guidelines and standards committee and the task force on echocardiography in clinical trials.** J Am Soc Echocardiog. 17(10): 1086-1119.

- Guzzo-Merello, G., Cobo-Marcos, M., Gallego-Delgado, M. i Garcia-Pavia, P. (2014). **Alcoholic cardiomyopathy**. World J Cardiol. 6(8): 771-781.
- Guzzo-Merello, G., Segovia, J., Dominguez, F., Cobo-Marcos, M., Gomez-Bueno, M., Avellana, P., Millan, I., Alonso-Pulpon, L. i Garcia-Pavia, P. (2015). **Natural History and Prognostic Factors in Alcoholic Cardiomyopathy**. JACC: Heart Failure. 3(1): 78-86.
- Hill, J. A. i Olson, E. N. (2008). **Cardiac Plasticity**. New England Journal of Medicine. 358(13): 1370-1380.
- Jin, X., Xia, L., Wang, L., Shi, J., Zheng, Y., Chen, W., Zhang, L., Liu, Z., Chen, G. i Fang, N. (2006). **Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats**. Proteomics. 6(7): 2326-2326.
- JNC (1993). **The fifth report of the joint national committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC V)**. Archives of Internal Medicine. 153(2): 154-183.
- Jones, J. I. i Clemmons, D. R. (1995). **Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions**. Endocr Rev. 16(1): 3-34.
- Jouliia-Ekaza, D. i Cabello, G. (2006). **Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects**. Exp Cell Res. 312(13): 2401-2414.
- Kaplan, N. M. i Flynn, J. T., 2006. Kaplan's clinical hypertension. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Lang, C. H., Frost, R. A., Svanberg, E. i Vary, T. C. (2004). **IGF-I/IGFBP-3 ameliorates alterations in protein synthesis, eIF4E availability, and myostatin in alcohol-fed rats**. Am J Physiol Endocrinol Metab. 286(6): E916-E926.
- Lang, C. H., Kimball, S. R., Frost, R. A. i Vary, T. C. (2001). **Alcohol myopathy: impairment of protein synthesis and translation initiation**. Int J Biochem Cell Biol. 33(5): 457-473.
- Lee, W. K. i Regan, T. J. (2002). **Alcoholic Cardiomyopathy: Is It Dose-Dependent?** Congestive Heart Failure. 8(6): 303-312.



- Leroith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. i Roberts, A. T. (1995). **Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.** Endocr Rev. 16(2): 143-163.
- Levy, D., Larson, M. G., Vasan, R. S., Kannel, W. B. i Ho, K. L. (1996). **The progression from hypertension to congestive heart failure.** JAMA-J Am Med Assoc. 275(20): 1557-1562.
- Lip, G. Y. H., Felmeden, D. C., Li-Saw-Hee, F. L. i Beevers, D. G. (2000). **Hypertensive heart disease. A complex syndrome or a hypertensive ‘cardiomyopathy’?** Eur Heart J 21(20): 1653-1665.
- Llisterri, J. L., Rodriguez-Roca, G. C., Escobar, C., Alonso-Moreno, F. J., Prieto, M. A., Barrios, V., González-Alsina, D., Divisón, J. A., Pallarés, V., Beato, P., Physicians, o. b. o. t. W. G. o. A. H. o. t. S. S. o. P. C. i inv, t. P. (2012). **Treatment and blood pressure control in Spain during 2002–2010.** Journal of hypertension. 30(12): 2425-2431.
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redón, J., Zanchetti, A., Böhm, M., Christiaens, T., Cifkova, R., De Backer, G., Dominiczak, A., *et al.* (2013). **2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).** J Hypertens. 31(7): 1281-1357.
- Maron, B. J. (2008). **The 2006 American Heart Association Classification of Cardiomyopathies Is the Gold Standard.** Circulation: Heart Failure. 1(1): 72-76.
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A. J., Seidman, C. E. i Young, J. B. (2006). **Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention.** Circulation. 113(14): 1807-1816.
- McKoy, G., Bicknell, K. A., Patel, K. i Brooks, G. (2007). **Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation.** Cardiovascular Research. 74(2): 304-312.

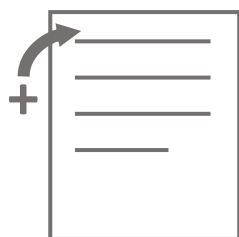
- Niemelä, O., Parkkila, S., Worrall, S., Emery, P. W. i Preedy, V. R. (2003). **Generation of aldehyde-derived protein modifications in ethanol-exposed heart.** Alcohol Clin Exp Res. 27(12): 1987-1992.
- Palmer, R., Wilson, R., Coward, P. i Scott, D. (2003). **Analysis of circulating insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding protein-3 (IGFBP-3) in tobacco smokers and non-smokers.** Tob Induc Dis. 1(2): 157 - 170.
- Parry, C. D., Patra, J. i Rehm, J. (2011). **Alcohol consumption and non-communicable diseases: epidemiology and policy implications.** Addiction. 106(10): 1718-1724.
- Planavila, A. i Fernández-Solà, J. (2015). **Role of Novel cardiomyokines FGF21 and Metrnl on cardiac damage induced by alcohol and arterial hypertension.** LA MARATÓ. Generalitat de Catalunya. 2015/33/31:
- Planavila, A., Fernández-Solà, J. i Villarroya, F., 2017. **Chapter Nine - Cardiokines as Modulators of Stress-Induced Cardiac Disorders.** In: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. Academic Press, pp: 227-256.
- Preedy, V. R., Adachi, J., Peters, T. J., Worrall, S., Parkkila, S., Niemela, O., Asamo, M., Ueno, Y., Takeda, K., Yamauchi, M., Sakamoto, K., Takagi, M., Nakajima, H. i Toda, G. (2001). **Recent advances in the pathology of alcoholic myopathy.** Alcohol Clin Exp Res. 25: 54S-59S.
- Preedy, V. R., Patel, V. B., Why, H. J. F., Corbett, J. M., Dunn, M. J. i Richardson, P. J. (1996). **Alcohol and the heart: biochemical alterations.** Cardiovasc Res. 31(1): 139-147.
- Rehm, J., Mathers, C., Popova, S., Thavorncharoensap, M., Teerawattananon, Y. i Patra, J. (2009). **Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders.** The Lancet. 373(9682): 2223-2233.
- Rehm, J., Room, R., Graham, K., Monteiro, M., Gmel, G. i Sempos, C. T. (2003). **The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview.** Addiction. 98(9): 1209-1228.
- Ren, J., Samson, W. K. i Sowers, J. R. (1999). **Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease.** J Mol Cell Cardiol. 31(11): 2049-2061.

- Ren, J. i Wold, L. E. (2008). **Mechanisms of alcoholic heart disease.** Ther Adv Cardiovasc Dis. 2(6): 497-506.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G. i Goodwin, J. (1996). **Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies.** Circulation. 93(5): 841-842.
- Rodrigues, P., Santos-Ribeiro, S., Teodoro, T., Gomes, F. V., Leal, I., Reis, J. P., Goff, D. C., Gonçalves, A. i Lima, J. A. C. (2018). **Association Between Alcohol Intake and Cardiac Remodeling.** Journal of the American College of Cardiology. 72(13): 1452-1462.
- Rose, A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlić, A. i Rose, P. W. (2018). **NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes.** Bioinformatics. 34(21): 3755-3758.
- Rusyn, I. i Bataller, R. (2013). **Alcohol and toxicity.** Journal of hepatology. 59(2): 387-388.
- Sadoshima, J. i Izumo, S. (1997). **The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.** Annu Rev Physiol. 59(1): 551-571.
- Sell, C., Baserga, R. i Rubin, R. (1995). **Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis.** Cancer Res. 55(2): 303-306.
- Sharkey, S. W., Lesser, J. R., Zenovich, A. G., Maron, M. S., Lindberg, J., Longe, T. F. i Maron, B. J. (2005). **Acute and Reversible Cardiomyopathy Provoked by Stress in Women From the United States.** Circulation. 111(4): 472-479.
- Shield, K. D., Parry, C. i Rehm, J. (2014). **Chronic Diseases and Conditions Related to Alcohol Use.** Alcohol Research : Current Reviews. 35(2): 155-171.
- Shyu, K.-G., Ko, W.-H., Yang, W.-S., Wang, B.-W. i Kuan, P. (2005). **Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes.** Cardiovasc Res. 68(3): 405-414.

- Spies, C. D., Sander, M., Stangl, K., Fernandez-Solà, J., Preedy, V. R., Rubin, E., Andreasson, S., Hanna, E. Z. i Kox, W. J. (2001). **Effects of alcohol on the heart.** Curr Opin Crit Care. 7(5): 337-343.
- Tong, D., Wu, X., Sun, H., Jin, Y., Liu, Z. i Zhou, F. (2012). **Expression changes and regulation of AR and IGF-1 in PC3 prostate cancer cells treated with sexual hormones and flutamide.** Tumor Biol. 33(6): 2151-2158.
- Urbano-Márquez, A., Estruch, R., Fernández-Solá, J., Nicolás, J. M., Paré, J. C. i Rubin, E. (1995). **The Greater Risk of Alcoholic Cardiomyopathy and Myopathy in Women Compared With Men.** JAMA. 274(2): 149-154.
- Urbano-Márquez, A., Estruch, R., Navarro-Lopez, F., Grau, J. M., Mont, L. i Rubin, E. (1989). **The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle.** New Engl J Med. 320(7): 409-415.
- Urbano-Márquez, A. i Fernández-Solà, J. (2004). **Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle.** Muscle Nerve. 30(6): 689-707.
- Wagner, K. R., Liu, X., Chang, X. i Allen, R. E. (2005). **Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin.** P Natl Acad Sci USA. 102(7): 2519-2524.
- WHO, 2018. Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO/ISFC (1980). **Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies.** British Heart Journal. 44(6): 672-673.
- WHO/ISFC (1996). **Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies.** Circulation. 93(5): 841-842.
- Wu, Y.-S., Zhu, B., Luo, A.-L., Yang, L. i Yang, C. (2018). **The Role of Cardiokines in Heart Diseases: Beneficial or Detrimental?** BioMed Research International. 2018: 14.
- Yang, W., Zhang, Y., Ma, G., Zhao, X., Chen, Y. i Zhu, D. (2005). **Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts.** Biochem Bioph Res Co. 326(3): 660-666.

- Yi, C., Ma, C., Xie, Z., Zhang, G., Song, W., Zhou, X. i Cao, Y. (2013). **Down-regulation of programmed cell death 5 by insulin-like growth factor 1 in osteoarthritis chondrocytes.** Int Orthop. 37(5): 937-943.
- Zhang, B., Turdi, S., Li, Q., Lopez, F. L., Eason, A. R., Anversa, P. i Ren, J. (2010). **Cardiac overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction but not hypertrophy: Roles of Akt, mTOR, GSK3 $\beta$ , and PTEN.** Free Radical Bio Med. 49(7): 1238-1253.
- Zhou, B., Bentham, J., Di Cesare, M., Bixby, H., Danaei, G., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Singh, G., Hajifathalian, K., Bennett, J. E., *et al.* (2017). **Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants.** The Lancet. 389(10064): 37-55.





## Annex 1

---

Aquest annex inclou la documentació del Comitè d'Ètica de l'Hospital Clínic de Barcelona i el consentiment informat per a les donacions





12<sup>th</sup> of May , 2011

Begoña Gómez, MD, acting as Secretary for the Hospital Clínic of Barcelona Institutional Review Board, hereby declares that:

The IRB evaluated and discussed the research protocol entitled "Cell Death in Alcoholic Heart and Muscle", presented by Professor Joaquim Fernandez-Sola as the principal investigator and Professor Álvaro Urbano-Marquez as co-principal investigator from the Hospital Clínic.

The IRB has considered that the protocol fulfills all applicable basic and standard ethical principles of human and animal research, and the protocol was approved today for one year.

Barcelona, 12<sup>th</sup> of May, 2011

CLÍNIC  
BARCELONA

Hospital Universitari

COMITÈ ÈTIC  
INVESTIGACIÓ CLÍNICA



**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Sr/Sra....., con DNI.....  
En representación del paciente/donante Sr/Sra.....

Paciente del Instituto/Servicio/Unidad..... del hospital  
Clínic de Barcelona

**MANIFIESTO VOLUNTARIAMENTE:**

Que he estado informado por el equipo médico que me atiende sobre el estudio "Role of the novel cardiomyokines FGF21 and Metrnl on cardiac damage induced by alcoholism and arterial hypertension." en músculo cardíaco de donantes, que se está realizando el Grupo de Investigación en Patología Cardíaca por Alcohol de este centro (IDIBAPS) en colaboración con el Departamento de Biología de la Universitat de Barcelona

Acepto la donación de muestras de miocardio  (marcar)

La información que me ha sido dada es comprensible y mis preguntas al respecto han sido contestadas, por lo que tomo libremente la decisión de autorizar el referido procedimiento de toma de muestras de corazón de donante, entendiéndolo que puedo revocar mi decisión en cualquier momento.

Las muestras serán utilizadas solamente con finalidad científica de investigación médica para este estudio referido. Las muestras sobrantes se destruirán. La información será codificada y se preservará absolutamente el anonimato del paciente donante.

Este estudio está coordinado por el DR JOAQUIM FERNANDEZ SOLA, investigador principal, a quien pueden dirigir cualquier duda o necesidad de información complementaria Teléfono: 659107529, Mail: jfernand@clinic.ub.es

En prueba de conformidad, firmo el presente documento

Barcelona, a...de.....de 201....

↳ Testimoni d'Exposició hipertensiva amb consum d'IGF-1

↳ Relació amb el pàrament de desenvolupament de miocardiopatia.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

