



Estudi de la regeneració miocàrdica en la miocardiopatia alcohòlica i la seva relació amb el dany funcional i estructural miocàrdic, activació d'apoptosi i activitat miostatina

Meritxell Lluís Padierna

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DE LA REGENERACIÓ MIOCÀRDICA EN LA
MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA I LA SEVA
RELACIÓ AMB EL DANY FUNCIONAL I
ESTRUCTURAL MIOCÀRDIC, ACTIVACIÓ
D'APOPTOSI I ACTIVITAT MIOSTATINA**

Departament de Medicina

Universitat de Barcelona

Meritxell Lluís Padierna

Desembre 2010

A la June, efimera però poderosa

- Programa de Doctorat: D4E05 BIOPATOLOGIA EN MEDICINA. Departament de Medicina. UB.

- Títol de la tesi: ESTUDI DE LA REGENERACIÓ MIOCÀRDICA EN LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA I LA SEVA RELACIÓ AMB EL DANY FUNCIONAL I ESTRUCTURAL MIOCÀRDIC, ACTIVACIÓ D'APOPTOSI I ACTIVITAT MIOSTATINA

- Lloc on s'ha dut a terme la tesi: Universitat de Barcelona. Hospital Clínic.

- Doctoranda: MERITXELL LLUÍS PADIERNA, llicenciada en Medicina i Cirurgia. Especialista en Medicina Interna.

- Director de la tesi: JOAQUIM FERNÁNDEZ SOLÀ, professor agregat del Departament de Medicina de la Facultat de Medicina de la UB, Metge Consultor Senior del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Signatures:

Meritxell Lluís Padierna

Dr Joaquim Fernández Solà

Desembre 2010

El Doctor Joaquim Fernández Solà, professor agregat del Departament de Medicina de la Facultat de Medicina de la UB, Metge Consultor Senior del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Clínic de Barcelona.

INFORMA que la memoria titulada **“ESTUDI DE LA REGENERACIÓ MIOCÀRDICA EN LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA I LA SEVA RELACIÓ AMB EL DANY FUNCIONAL I ESTRUCTURAL MIOCÀRDIC, ACTIVACIÓ D'APOPTOSI I ACTIVITAT MIOSTATINA”** presentada per Meritxell Lluís Padierna amb DEA obtingut el juliol de 2006, ha estat realitzada sota la meva direcció. Considero que reuneix les condicions necessàries per a ser defensada davant del Tribunal corresponent per a optar al grau de Doctora en Medicina i Cirurgia.

Dr Joaquim Fernández Solà

ÍNDEX	Pàgina
1. AGRAÏMENTS	7
2. ABREVIATURES	9
3. INTRODUCCIÓ	10
3.1. Justificació personal	11
3.2. Conceptes sobre l'homeostasi cardíaca	14
3.2.1.- Perspectiva històrica	14
3.2.2.- El cicle cel.lular	15
3.2.3.- Mecanismes d'adaptació cardíacs	17
3.2.4.- Apoptosi i com s'avalua	20
3.2.4.1. Conceptes bàsics de mort cel.lular	20
3.2.4.2. L'apoptosi	26
3.2.5.- Regeneració i com s'avalua	28
3.2.6.- Miostatina	35
3.3. Miocardiopatia alcohòlica	37
3.4. Miocardiopatia hipertensiva	43
4. HIPÒTESI DE TREBALL	48
5. OBJECTIUS DE TREBALL	53
6. TREBALLS PUBLICATS	55
6.1. Increased myostatin activity and decreased myocyte proliferation in chronic alcoholic cardiomyopathy.	57
6.2. Evaluation of myocyte proliferation in alcoholic cardiomyopathy, telomerase enzyme activity (TERT) compared to ki-67 expression.	60
7. RESUM DE RESULTATS	63
8. DISCUSSIÓ	68
9. CONCLUSIONS	81

	Index
10. ANNEXES	84
11. BIBLIOGRAFIA	89

1. AGRAÏMENTS

A la meva filla June, motor definitiu i indiscutible d'aquesta tesi que em va ajudar fins el seu últim moment.

Al Txema, pel seu amor inquebrantable a prova de tot, pel seu suport i per donar-me “una empenteta” quan l'ànim em flaquejava.

Als meus pares que m'han transmès valors com l'esforç i l'afany de superació gràcies als quals m'he convertit en una dona forta i emprenedora.

Al meu tutor i director d'aquest treball, el Dr Joaquim Fernández Solà sense el suport del qual no hagués pogut tirar endavant tota la feina feta. Al Grup de Recerca d'Alcohol del Servei de Medicina Interna: Professor Álvaro Urbano-Márquez, Dr Emilio Sacanella, Dr Ramon Estruch i Dr Francesc Fatjó per convidar-me a treballar amb ells i per tot el suport rebut.

Al personal del laboratori del Clínic, especialment a en Sergi Castellví i a la Jenny per a iniciar-me en el món de les pipetes i els centrifugats.

A en Xavi Bosch i a l'Albert Bové que han anat seguint els meus passos, sempre animant-me (“tachín-tachín”).

A la meva “família” del Clínic: a tots els adjunts de Medicina Interna que m'han format com a especialista, fent menció especial a en Cesc Cardellach; a tots els meus “R grans”, especialment a en Francesc, la M^a José i l'Anna; als adjunts d'Urgències, sobretot a l'Òscar, la Carme, la Blanca, en Jota, l'Ernest i en Gerard. Tots ells m'han ensenyat a qüestionar-m'ho tot, a raonar i a fer prevaldre el sentit comú.

Als meus “co-R” de Medicina Interna: en Joan Carles, la Sira, l’Elisa i la Bea i també a la Silvia, a en Manuel i a la Ita. Per les vivències compartides i pel seu companyerisme i amistat.

A en Santi Nogué, un exemple de dedicació a la formació del resident amb el seu esperit docent.

A tot el personal d’infermeria de Medicina Interna i d’Urgències, sempre al meu costat per a salvar situacions complicades.

Al Dr Esteve Llargués, el meu cap a l’Hospital General de Granollers i de qui he rebut tot el suport i facilitats per a acabar aquesta tesi.

2. ABREVIATURES

ACXFA: arítmia complerta per fibril·lació auricular

Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1

ARA-II: antagonistes del receptor de l'angiotensina II

BAX: bcl-2-associated X protein

BCL-2 protein: proteïna que codifica pel gen del Limfoma de Cèl.lula B

HTA: hipertensió arterial

IA: index apoptòtic

IC: insuficiència cardíaca

ICT: index cardio-toràcic

IECA: inhibidor de l'enzim convertidor de l'angiotensinogen

IGF-1: insulin growing factor-1

IMC: índex de massa corporal

MCP: miocardiopatia

Mst-1: mammalian sterile 20-like 1

NYHA: New York Heart Association

PCR: proteïna C reactiva

RNA: acid ribonucleic

TBP: TATA binding protein

TERT: enzim retro-transcriptor de la telomerasa / telomerasa transcriptasa inversa

TNF: factor de necrosi tumoral

TPM: transplantament i donació d'òrgans

VE: ventricle esquerre

XIAP: X-lligat inhibidor de l'apoptosi proteïna

3. INTRODUCCIÓ

3. INTRODUCCIÓ

3.1. JUSTIFICACIÓ PERSONAL DE LA TESI

Aquesta tesi s'emmarca dins la línia d'estudi patogènic de la Miocardiopatia Alcohòlica Crònica que el Grup de Recerca de Malalties Relacionades amb el consum d'Alcohol i Patologia Muscular va iniciar el 1982. Aquest grup d'investigació pertany al Servei de Medicina Interna i al grup de Neurociències IDIBAPS (Grup de treball 7.04) estant actualment integrat en el "nodo CIEN de Investigación Neurológica". Els treballs realitzats per aquest grup han aprofundit sobre els següents aspectes:

1. L'efecte nociu dosi-depenent del consum crònic d'alcohol en el desenvolupament de toxicitat miocàrdica, amb relació inversa entre consum acumulat d'alcohol i funció ventricular; l'associació entre la miocardiopatia alcohòlica (MCP alcohòlica) i altres patologies orgàniques per consum d'alcohol com la miopatia esquelètica, l'hepatopatia crònica o les lesions neurològiques centrals i perifèriques per consum d'alcohol.
2. La constatació de la susceptibilitat de gènere a l'efecte tòxic de l'alcohol, corroborant que les dones són més sensibles que els homes al desenvolupament de depressió de la funció ventricular.
3. La susceptibilitat genètica, evidenciant que els individus amb genotip "DD" del gen de la ECA presenten un risc 16 cops més gran de desenvolupar una MCP alcohòlica respecte els altres genotips.
4. La implicació de l'apoptosi en els processos de dany muscular induït per l'alcohol.
5. L'objectivació de les alteracions oxidatives tissulars al múscul miocàrdic per consum d'alcohol.

6. La parcial reversibilitat dosi-depenent de la repercussió clínica i funcional cardíaca per consum d'alcohol.

Per a la realització d'aquests projectes s'ha aconseguit un successiu finançament per part de diferents entitats públiques com la Generalitat de Catalunya (CUIR 1999/SGR-279 i 2001/SGR-379), el *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 94/1114; 98/0330; 99/0115; 99/0318; PI020611; PI020533; PI041837); el *Instituto de Salud Carlos III* (*Red temática sobre nutrición y enfermedad cardiovascular V-2003-RED G140-0*), el *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (INIA) (VINO1-006), la Unió Europea (Projecte FAIR de la Comissió Europea [exp.: CT97-3261]) y el *Ministerio de Ciencia y Tecnología*. (AGL2004-08378-C02-02/ALI). Actualment està en el grup *Nutrición y Alcohol. Acción CIBER en el marco del plan I+D 2004-2007 CB06/03/0019*.

Altres línies d'investigació que actualment estan en desenvolupament dins del Grup són:

- Efecte tòxic sobre el sistema nerviós central i perifèric
- Efectes beneficiosos del consum moderat de begudes alcohòliques
- Estudi dels paràmetres inflamatoris que poden predir l'arteriosclerosi en els pacients alcohòlics
- Efecte dels polifenols que conté el vi respecte les altres begudes alcohòliques en el risc cardiovascular
- Estudi de les mol.lècules d'adhesió endotelial relacionades amb l'arteriosclerosi i amb la disminució en l'adhesió dels monòcits circulants a l'endoteli

- Influència de la dieta mediterrània sobre el risc cardiovascular en prevenció primària (PREDIMED FAIR CT97-3261).

La doctoranda, MERITXELL LLUÍS PADIERNA, es va incorporar a aquest grup de recerca l'any 2002 col.laborant de forma regular en l'assistència dels pacients amb consum crònic d'alcohol tant hospitalitzats com a nivel ambulatori, en la detecció de patologia orgànica relacionada amb l'alcohol i elaboració i suport a les línies d'investigació que des de llavors ha desenvolupat el grup; ha rebut preparació tècnica específica sobre el processament de mostres biològiques procedents d'aquests malalts; ha realitzat un curs específic de formació en Transplantaments i Donació d'Òrgans (TPM), el que li ha facilitat el procés de recollida de mostres procedents de donants en mort cerebral, fet fonamental pel desenvolupament d'aquesta tesi tal i com s'especifica més endavant en l'apartat de Material i Mètodes; coneix les tècniques convencionals d'immunohistoquímica muscular aplicables a l'estudi d'aquests pacients, així com els treballs realitzats sobre apoptosi i susceptibilitat genètica a les lesions cardíques per consum d'alcohol. Finalment, ha col.laborat i és co-autora d'un treball sobre repercussió tissular dels mecanismes d'oxidació cel.lular en resposta al consum d'alcohol en un grup de donants d'òrgans molt similar al que s'estudia en la present tesi. Ha col.laborat com a co-investigadora en el projecte FISS *Efecto de los polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina-aldosterona en la presentación clínica y evolución de la miocardiopatía alcohólica. 02/0535.*

Se li va concedir el premi Final de Residència el 2005 per a iniciar el treball que ha culminat en la present tesi doctoral, essent-ne l'aspecte més rellevant el paper de la regeneració miocàrdica en la MCP alcohòlica.

3.2. CONCEPTES SOBRE L'HOMEOSTASI CARDÍACA

3.2.1.- Perspectiva històrica

El cor és un òrgan postmitòtic i, per tant, constituït per un conjunt més o menys estable de cèl·lules des del naixement de l'individu fins la senectud (1). Aquest ha estat el dogma imperant fins fa pocs anys, però fent una ullada retrospectiva a la història veurem que no sempre ha estat així.

Entre els anys 1850 i 1911 es van dur a terme nombrosos estudis, principalment a Alemanya, que postulaven que l'existència d'hipertrofia miocàrdica era conseqüència de la suma de la hipertrofia i la hiperplàsia dels miocardiòcits existents al cor. Aquesta teoria es va posar en dubte els anys 20, on s'atribuïa la hipertrofia miocàrdica exclusivament a la hipertrofia dels miocardiòcits, sense contemplar la hiperplàsia. Els científics de l'època basaren la seva teoria en l'absència de figures mitòtiques en els miocardis que estudiaren. Per tant, l'absència de mitosis en el miocardi equivalia a absència de proliferació miocàrdica (2).

Entre els anys '40 i '50 Linzbach postulà l'existència d'hiperplàsia a més de la hipertrofia com a mecanismes que conduïen a la hipertrofia miocàrdica. Aquest autor sostenia que quan el cor assolía un pes igual o superior a 500g s'estimulaven en els miòcits mecanismes de proliferació, convertint-se aquest en la principal forma de creixement miocàrdic afegit a la hipertrofia ja existent (2). Les troballes de Linzbach es dueren a terme en ventricle esquerre humà i posteriorment es realitzaren troballes similars a ventricle dret (3). Els anys '70 es va contradir aquesta teoria però els estudis realitzats en la darrera dècada demostren que Linzbach tenia raó. Part de la confusió ve donada per la coexistència de cèl·lules mononucleades (3/4 parts) i binucleades (1/4 part) al miocardi. La presència de regeneració miocàrdica s'ha de demostrar per la

presència de mitosi, evidenciant els fenòmens de cariorexi (divisió nuclear) i de citocinesi (divisió nuclear i plasmàtica). Fins la dècada dels 90, només s'havia evidenciat mitosi en estudis in vitro. L'estudi d'Anversa i cols el 1998 demostrà, in vivo, l'existència de figures mitòtiques en cors humans adults afectes de cardiopatia isquèmica i d'insuficiència cardíaca en fase terminal. En aquest treball s'utilitzà la microscopia confocal que permeté mesurar l'índex mitòtic. Aquest índex és tan baix i es du a terme tan ràpidament que no s'havia detectat en els estudis realitzats en dècades anteriors. Actualment disposem de la tecnologia adequada i és per això que s'ha pogut constatar. El fet de que l'índex mitòtic sigui baix no implica que tingui un paper marginal en la regeneració de miocardiòcits. Així, un home de 45 anys té $5'2 \times 10^9$ nuclis al ventricle esquerre, amb un índex mitòtic de 11 nuclis $\times 10^6$ i amb un temps mitòtic d'una hora, genera 10% de miòcits nous en un any (2).

Definitivament, l'estudi d'Anversa i cols ha posat de manifest la presència de regeneració miocàrdica en el cor adult dels humans i d'altres mamífers, fet que ha estimulat la posada en marxa de múltiples estudis els darrers 10 anys per a aprofundir i conèixer millor els mecanismes que influeixen en l'homeostasi miocàrdica del cor humà, tant en condicions fisiològiques com patològiques. Per a fer-ho, s'han revisat conceptes relacionats amb el funcionament del cicle cel.lular, la plasticitat i la capacitat de remodelació cardíaca, l'apoptosi i la regeneració.

3.2.2.- El cicle cel.lular

Totes les cèl.lules de l'organisme experimenten fenòmens de creixement i divisió cel.lular, constituint el que anomenem cicle cel.lular. El cicle cel.lular es pot dividir bàsicament en 2 moments: la interfase (I), on es duen a terme els fenòmens de replicació i la mitosi o fase M, on té lloc la divisió cel.lular (Figura 1).

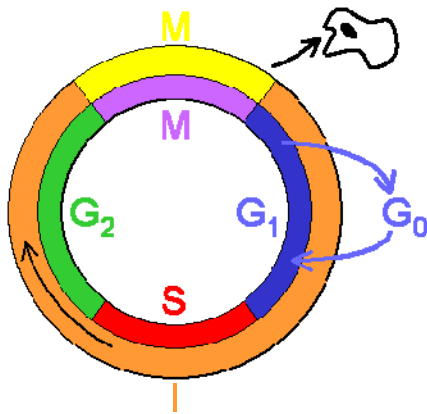


Figura 1. Cicle cel·lular. Figura que il·lustra els dos moments del cicle cel·lular: la mitosi i la interfase; aquesta darrera està subdividida en tres subfases: G1, S i G2.

Cortesia de www.dialogica.com

La interfase està subdividida en tres subfases que s'anomenen G1, S i G2. La G1 és la més llarga i és en la que la cèl·lula creix, augmenta la massa cel·lular. En aquest moment la cèl·lula és sensible a l'acció dels mitògens i els factors de creixement. La S és la fase de síntesi i de replicació del DNA. La subfase G2 és el moment on es realitza la reparació del DNA.

En la fase M té lloc la mitosi, on la cèl·lula mare reparteix el seu material genètic entre les dues filles i la citocinesi, on la cèl·lula mare reparteix el citoplasma entre les dues filles. La cèl·lula pot sortir del cicle cel·lular i quedar en estat de quiescència o G0, podent reentrar al cicle a G1 (4).

Molts teixits de mamífers tenen capacitat replicativa enfront un insult (i per tant, capacitat de reentrar en el cicle cel·lular), però el cor en té poca i és insuficient per a combatre un insult greu o difús sobre el miocardi (5).

Els miocardiòcits fetals pateixen un ràpid creixement i replicació, els miocardiòcits perinatals ja no proliferen però presenten mitosis acitoquinètiques (sense divisió cel·lular). En canvi, la gran majoria dels miocardiòcits adults humans són cèl·lules que no reentren en el cicle cel·lular malgrat l'existència d'estímuls mitogènics normals o d'estrès. És així perquè han sortit de forma permanent del cicle cel·lular i

perque tenen característiques específiques que mostren la seva especialització com a cèl.lula (5). La maduració del miocardi s'atura en quant els miocardiòcits surten del cicle cel.lular en el període post-natal i, per tant, queden detinguts en els cicles G0/G1 (85%) i G2/M (15%). Per aquest motiu, el cor té una capacitat limitada per a respondre enfront un estrés agut sobre el miocardi, produïnt-se diferents tipus de dany sobre el miocardiòcit; per respondre enfront un estrés crònic activa els mecanismes d'hipertròfia i remodelació miocàrdics (6).

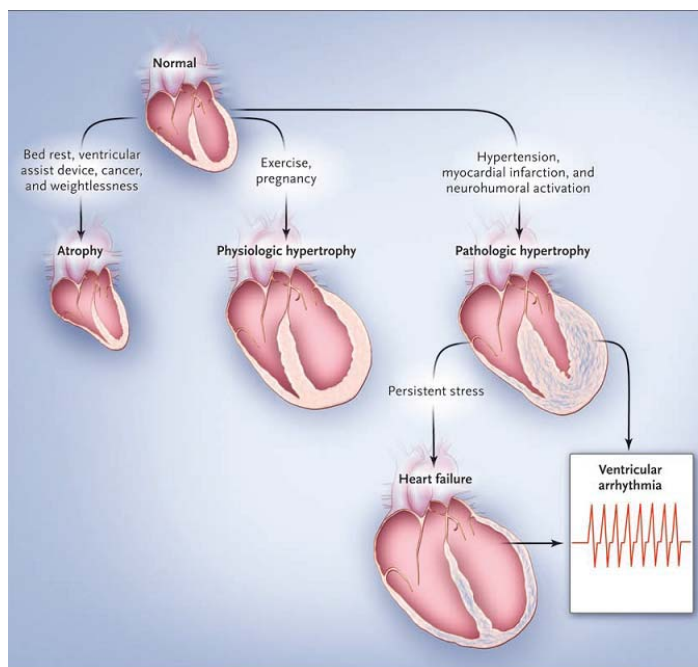
Novedoses línies d'investigació desenvolupades en la darrera dècada van dirigides a aprofundir i comprendre millor el funcionament del cicle cel.lular, ja que les darreres hipòtesis apunten a que els miocardiòcits tenen la capacitat de reentrar-hi i que, per tant, hi ha cert grau de regeneració demostrat gràcies a l'existència de progenitors de miocardiòcits i *stem cells* que tenen una capacitat replicativa limitada. Encara no es coneixen del cert quins són els factors que influeixen en la reentrada del miocardiòcit en el cicle cel.lular. (5,6).

3.2.3 - Mecanismes d'adaptació cardíacs enfront estímuls fisiològics i patològics

El cor és un òrgan plàstic amb capacitat per adaptar-se als estímuls que reb ja siguin fisiològics, com el creixement o l'embaràs, o bé patològics com la hipertensió arterial (HTA), els tòxics o la isquèmia. Aquests estímuls activen uns complexes mecanismes de diferent etiologia (autocrina, paracrina, factors de creixement...) que afavoreixen l'expressió genètica i la síntesi proteica de determinats factors que ajuden al cor a adaptar-se a la nova situació. Els canvis secundaris a estímuls fisiològics només afecten el teixit miocàrdic, mentre que els patològics també afecten el teixit connectiu produïnt un acúmul de col.lagen (7).

El principal mecanisme d'adaptació del miocardi enfront un estímul crònic (sigui fisiològic o patològic) és la hipertròfia sense augment del n° de miocardiòcits (6,7). Segons la naturalesa de l'estímul el cor desenvolupa un o altre patró adaptatiu; si aquest estímul no es manté en el temps els canvis al miocardi poden ser reversibles. Si l'estímul es manté, la hipertròfia progressa a dilatació que, finalment, condueix a l'aparició d'insuficiència cardíaca i/o d'arítmies. Per contra, en situacions d'enllitament perllongat o càncer es produeix un fenomen d'atròfia miocàrdica (veure figura 2).

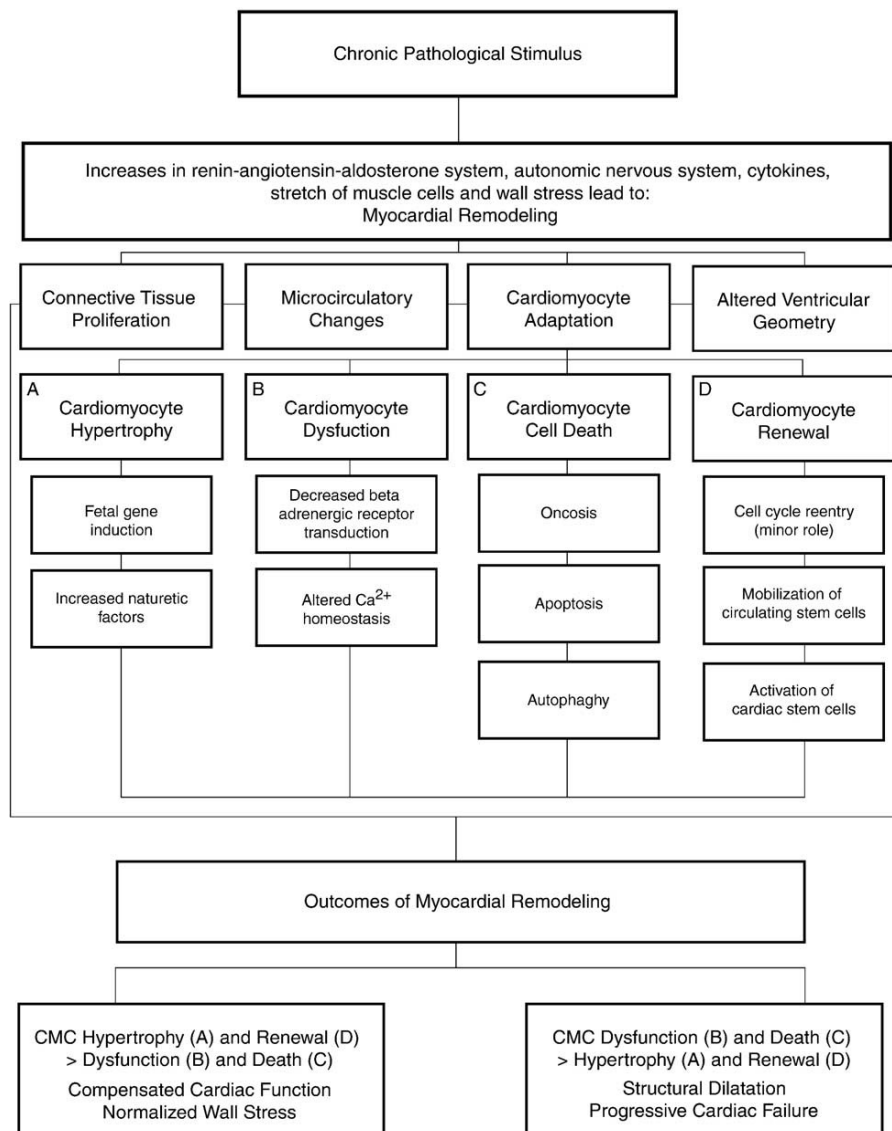
Figura 2. Condicions que condueixen a la remodelació cardíaca, resultant en atròfia o hipertròfia



Segons les circumstàncies, la remodelació cardíaca pot ser normal o patològica. Aquesta darrera està associada a una tendència a la descompensació clínica, la dilatació ventricular, la disfunció sistòlica i les alteracions electrofisiològiques que poden conduir a l'aparició d'arítmies ventriculars malignes. Figura extreta de l'article de Hill i cols. N Engl J Med 2008;358:1370-80.

Sota un estímul patològic crònic, el cor se sotmet a un procés de remodelació miocàrdica. Aquest és un complex procés de canvis en el miocardi, ja sigui en una o en les quatre cambres del cor, portant implícita la proliferació del teixit connectiu, canvis de la microcirculació, hipertròfia, disfunció, mort i regeneració del miocardiòcit.

Figura 3. Adaptació, mort i regeneració del miocardiòcit durant el process de remodelació miocàrdica degut a un estrès crònic.



Els estímuls crònics patològics estimulen la remodelació miocàrdica la qual produeix una alteració de la geometria ventricular, canvis en la microcirculació, proliferació del teixit connectiu i una adaptació del miocardiòcit tal i com il·lustra aquesta figura. Si els mecanismes d'hipertrofia (A) i regeneració (D) predominen sobre la disfunció (B) i la mort (C) del miocardiòcit s'aconseguirà normalitzar l'estrès de la paret ventricular i compensar la funció cardíaca. Si, en canvi, la disfunció (B) i la mort (C) del miocardiòcit predominen sobre els mecanismes d'hipertrofia (A) i regeneració (D) es produirà una dilatació estructural cardíaca i apareixerà clínica d'insuficiència cardíaca de forma progressiva. Figura extreta de l'article de Buja i cols. Cardiovascular Pathology 2008;17:349-374.

Tots aquests canvis que es produeixen en el teixit cardíac es duen a terme gràcies a l'acció de diferents reguladors que actuen en diversos punts del cicle cel·lular. Els més destacats en el desenvolupament d'hipertrofia miocàrdica en l'adult són: les ciclines i

les respectives kinases, el Myc i l'E2F (els dos darrers pertanyen al grup de factors de transcripció) (5).

3.2.4. L'apoptosi i com s'avalua

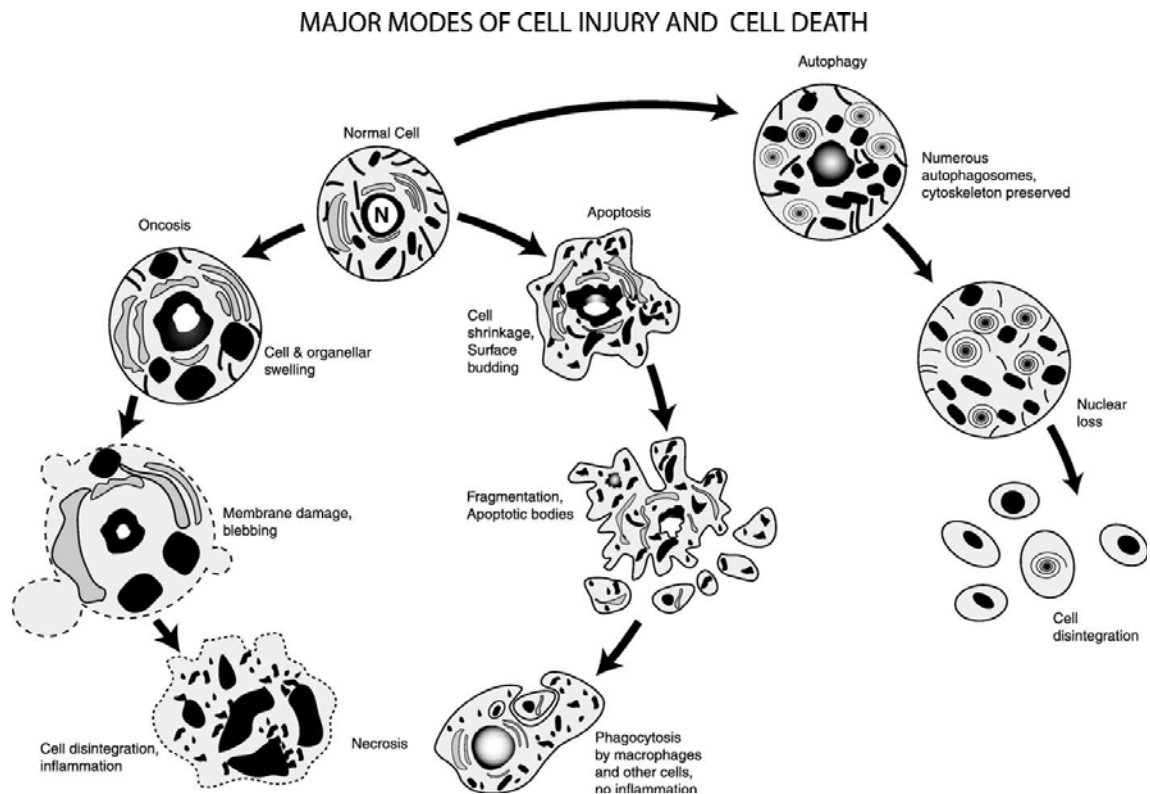
3.2.4.1. Introducció: conceptes bàsics sobre mort cel·lular

Tot procés de mort cel·lular es du a terme en tres fases:

- Fase pre-letal: en aquesta primera fase es produeixen canvis en la cèl·lula que són potencialment reversibles. Si el procés segueix endavant, la conduirà a dues possibles vies: l'oncosi i l'apoptosi.
- Fase letal: en aquesta fase la cèl·lula entra en un punt de no retorn en el que es produeix un increment del calci intracitosòlic així com un augment inespecífic de la permeabilitat de la membrana cel·lular.
- Fase de necrosi: és la fase final on convergeixen les vies d'oncosi i d'apoptosi i on es produeix la lisi cel·lular (8).

A continuació es defineixen els diferents tipus de mort cel·lular i s'il·lustren amb la següent figura.

Figura 4. Diagrama que il·lustra els trets citològics dels principals tipus de dany i mort cel·lular.



La cèl·lula normal conté un nucli (N) amb una mínima marginació de cromatina, filaments del citoesquelet (estructures linials) i organel·les, incloent els elements del reticle sarcoplasmàtic, lisosomes i mitocondria. Aquesta figura il·lustra les principals característiques de l'oncosi, l'apoptosi i l'autofàgia. La necrosi representa el darrer pas en el procés de degradació de la cèl·lula com a conseqüència d'un dany irreversible i és comú a tots els tipus de mort cel·lular. Figura extreta de l'article de Buja i cols. Cardiovascular Pathology 2008;17:349-374.

L'oncosi és un terme que va definir Joris com a conjunt de processos que condueixen a la destrucció cel·lular després d'una lesió irreversible, essent l'edema cel·lular el fenomen més destacable i característic. Aquest és un tipus de mort cel·lular passiu i accidental que sempre es produeix com a resposta a un estímul extern com ara la hipòxia, la isquèmia, els tòxics i les drogues i els fenòmens inflamatoris. En l'oncosi es produeix un dany directe de la membrana cel·lular, un dany de l'aparell respiratori mitocondrial, una proteolisi de les proteïnes del citoesquelet associades a la membrana cel·lular i una degradació dels fosfolípids de membrana. Tots aquests canvis tenen com

a conseqüència una alteració del metabolisme energètic amb una deplecció de la formació d'ATP, alteracions iòniques essent les més destacables la inhibició de l'ATPasa Na^+/K^+ , l'augment de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- i la pèrdua de K^+), la formació de vacúols i, finalment la inflamació i el trencament de la membrana i de la cèl.lula (6,9).

L'apoptosi és un tipus de mort cel.lular que es produeix de forma programada, regulat per un programa genètic de la pròpia cèl.lula. És un procés actiu que requereix energia i que es caracteritza principalment per una disrupció nuclear i cel.lular amb fragmentació però sense edema, a diferència de l'oncosi (6). Tot el procés de l'apoptosi es pot resumir en els següents passos:

1. Inici de la marginalització de la cromatina amb acúmul focal de masses de cromatina a la perifèria del nucli.
2. Desintegració dels nucleols i encongiment del nucli.
3. Fragmentació nuclear.
4. Retracció/disminució del volum citoplasmàtic.
5. Reorganització i compactació de les organel·les, dilatació del reticle sarcoplasmàtic i edema mitocondrial.
6. Convulsió de la superfície cel.lular.
7. Separació de les cèl.lules apoptòtiques de les cèl.lules veïnes.
8. Vacuolització citoplasmàtica: creació dels cossos apoptòtics.
9. Desprement dels cossos apoptòtics.
10. Fagocitosi dels cossos apoptòtics per macròfags i cèl.lules veïnes.

11. Absència de reacció inflamatòria en la destrucció cel.lular (9,10).

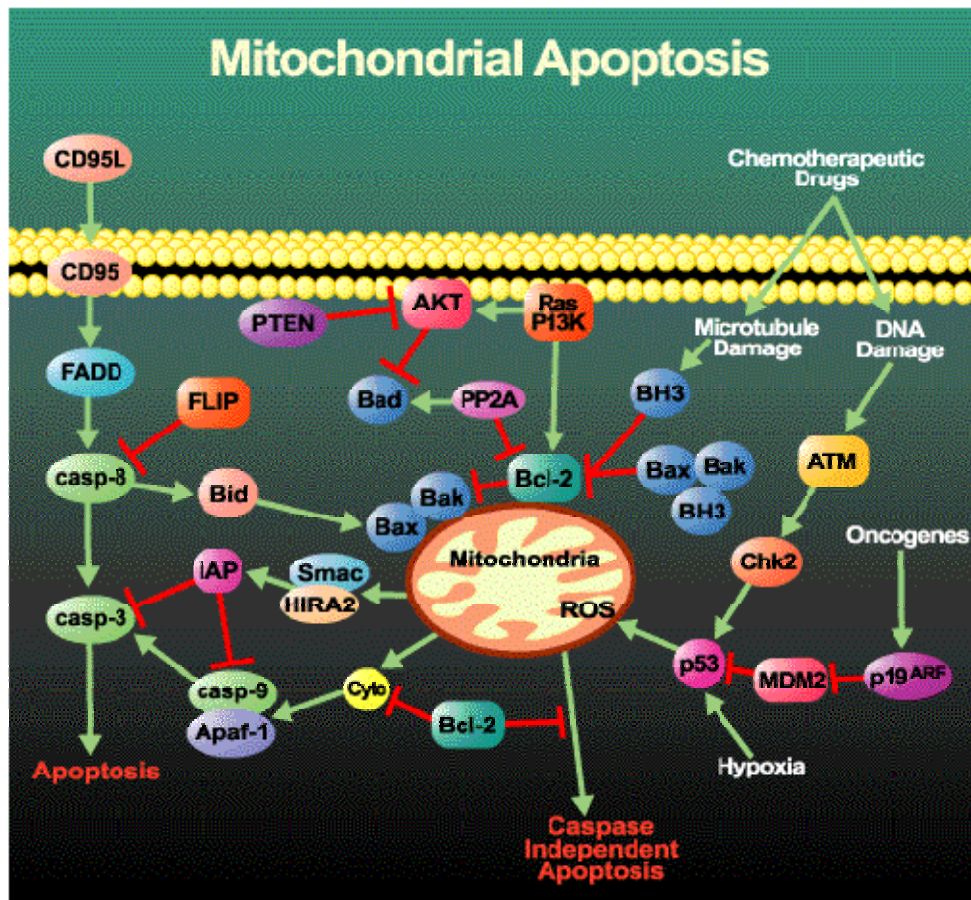
Tots aquests fenòmens es duen a terme mediat per dues vies d'acció: la via externa, que representa la fase d'iniciació de tot el procés d'apoptosi amb la implicació dels receptors de superfície de membrana i la via intrínseca que implica la mitocondria i el reticle sarcoplasmàtic. Totes dues vies condueixen a l'activació de les caspases, unes proteases específiques del citosol (6).

En la via externa s'inicia l'apoptosi a través de dues vies principals: la via Fas i la via TNF. El Fas és un receptor de membrana de la família del factor de necrosi tumoral (TNF), el lligand del qual s'anomena FasL. La seva acció apoptòtica ve vehiculitzada per l'òxid nítric. Té un paper rellevant en la regulació immunològica de manera que la seva inhibició es troba en diferents malalties limfoproliferatives i autoimmunes. El TNF és el prototip d'una àmplia família de citokines que interaccionen amb una superfamília de receptors, els TNF-R. La seva acció apoptòtica sovint ve mediada per un factor nuclear, el NF- κ B, que també pot activar-se per altres senyals com radicals superòxid o la proteïna cinasa C. La via externa té com a resultat final la formació d'un complex macromolecular que constitueix un inductor d'apoptosi a través de l'activació de les caspases, incloent el pas de procaspasa 8 a caspasa 8 activa (6).

La via intrínseca s'activa en resposta a diversos estímuls intra i extracel.lulars i bàsicament es caracteritza per:

- l'alteració de la mitocondria, on es forma un porus de transició de permeabilitat de la seva membrana interna que conduirà a l'edema mitocondrial i l'activació de factors proapoptòtics, i l'alliberament de citocrom C. Aquest darrer fet

Figura 6. Passos de la via externa i de la via intrínseca en el procés d'apoptosi miocárdica.



La característica clau del procés de l'apoptosi és el trencament del nucli amb la condensació i fragmentació de la cromatina en forma de mitja lluna, seguit de la fragmentació del nucli i el citoplasma en cossos apoptòtics que són ràpidament fagocitats per les cèl·lules adjacents (6).

L'apoptosi està regulada bàsicament per tres mecanismes: el BCL-2, el BAX i el XIAP. El BCL-2 és una proteïna d'acció anti-apoptòtica que es localitza a la membrana mitocondrial externa, el reticle sarcoplasmàtic i la membrana nuclear interna. Entre les seves funcions es troba protegir la membrana plasmàtica dels radicals lliures i de la peroxidació, evitar la recaptació de calci per part del nucli i inhibir la caspasa-3; el BAX

és una proteïna pro-apoptòtica que augmenta la permeabilitat de la membrana mitocondrial unint-se al porus de transició de permeabilitat de la mateixa; el XIAP té un efecte anti-apoptòtic ja que és un potent inhibidor de les caspases gràcies a la seva unió amb Apaf-1 al citosol i l'activació de la caspasa-9 (13).

La necrosi és el pas final en el que conflueixen l'oncosi i l'apoptosi. Es caracteritza per la presència d'hipereosinofília, picnosi nuclear, cariorrexi i cariolisi focal. El procés clau és el dany en la membrana cel.lular, secundari a l'augment de la seva permeabilitat i a la seva disrupció per l'acció de les fosfolipases calci-depenents (6,9).

L'autofàgia és un tipus de mort cel.lular programada i és un dels principals mecanismes implicats en els processos d'organogènesi i atròfia en resposta a l'envelliment i el dejú sostingut. És un procés intracel.lular de degradació mitjançant la formació d'autofagosomes, pèrdua nuclear que finalment condueixen a la desintegració cel.lular. No és un tipus de mort cel.lular que sigui rellevant en la fisiopatologia del miocardi, tot i que s'han detectat de forma aïllada alguns miocardiòcits en aquest procés (6).

3.2.4.2. L'apoptosi

Actualment s'accepta que la pèrdua de miocardiòcits és un factor determinant en l'aparició de disfunció ventricular i en l'evolució a una situació de fallida cardíaca terminal. (1, 14). En aquest procés el paper de l'apoptosi miocàrdica és rellevant, fet demostrat en diferents treballs que han evidenciat que les vies descrites en l'apoptosi en l'apartat anterior són operatives en els miocardiòcits (6).

També es coneix que és diferent el grau d'implicació funcional que té la mort cel·lular segons sigui difusa o segmentària. Es considera que és necessària una destrucció del 40-50% de miocardiòcits ventriculars per a que es produeixi insuficiència cardíaca per isquèmia coronària (pèrdua segmentària de miocardiòcits); en canvi, una pèrdua difusa del 10-20% de miocardiòcits pot suposar un deteriorament hemodinàmic similar (com en la MCP alcohòlica). L'apoptosi és especialment rellevant en aquest darrer cas, destacant el paper activador que hi tenen les caspases 3 i 8 (1, 15, 16).

En models transgènics animals s'ha corroborat la importància de l'equilibri necessari entre mort i regeneració dels miocardiòcits. La pèrdua d'aquest equilibri condueix al desenvolupament de miocardiopatia, disfunció ventricular progressiva i insuficiència cardíaca (1, 14, 15). En aquest procés s'han detectat alguns mecanismes desencadenants com són la sobreexpressió de tropomodulina o de Mst1 (15) o l'activació d'IGF-1 (1). L'ablació de la telomerasa resulta també en l'escurçament de les telomeres, l'activació de p53 i desencadenament de l'apoptosi (1).

Un dels fets més novedosos i contrastants és l'evidència de que un índex elevat de mort de miocardiòcits activa el procés de regeneració miocàrdica. En models transgènics animals, s'ha vist que l'apoptosi miocàrdica difusa va seguida d'un procés de reorganització compartimental dels miocardiòcits ventriculars amb un augment de volum d'aquesta cavitat i un estrenyiment de la seva paret. Això comporta un increment de la tensió de la paret i l'activació de més apoptosi, establint un mecanisme de re-entrada patològic que evoluciona a disfunció ventricular. Per tot això, no és sorprenent que la inhibició de la mort cel·lular per apoptosi atenüi l'evolució a disfunció ventricular, la hipertròfia reactiva i l'estrès diastòlic, demostrant així el paper crucial de l'apoptosi en aquest procés de remodelació ventricular (1, 17, 18, 19).

S'ha observat que en el cor sa existeix un cert grau d'apoptosi fisiològica que es veu incrementada de forma similar en diferents models d'insuficiència cardíaca d'etiologia diversa (isquèmica o no) (1, 15, 20). A l'hora d'analitzar l'apoptosi s'ha de fer des del punt de vista quantitatiu, emprant l'índex d'apoptosi (percentatge de cèl.lules amb apoptosi activa respecte el total en un moment donat) però també tenint en compte el temps en el desenvolupament d'aquest procés, variable poc coneguda. Experiments *in vitro* estimen que el procés d'apoptosi es realitza en unes 2 hores i s'estima que *in vivo* es perllonga fins a 4 hores (21). Aquestes dades no concorden amb la pèrdua real de massa ventricular en els models de miocardiopatia dilatada, en els que la meitat dels miocardiòcits es perdrien en uns 40 dies, quan en realitat aquest procés és molt més lent (1).

Aquestes troballes permeten concloure que, en absència de fenòmens d'hipertròfia miocàrdica, s'ha de considerar el paper que tenen altres factors com la regeneració epimòrfica (sense fibrosi) dels miocardiòcits, que compensarien la pèrdua prevista dels mateixos secundàriament a l'apoptosi (21). Per aquest motiu, la regeneració miocàrdica ha passat a ser un factor determinant en l'homeostasi miocàrdica en situacions de dany cel.lular sostingut, com en les miocardiopaties dilatades idiopàtiques o adquirides.

3.2.5. La regeneració

La regeneració cel.lular consisteix en substituir les cèl.lules perdudes i/o lesionades a conseqüència de processos fisiològics o patològics, per unes altres de noves de la mateixa estirp i amb les mateixes característiques.

El primer mecanisme en activar-se per a compensar un insult sobre el miocardi (p.ex HTA) és la hipertròfia sense regeneració, com ja va postular Linzbach els anys '50 i, més tard, s'inicia la regeneració. Per tant, per a evidenciar la regeneració en un miocardi cal tenir en compte el factor temps (2).

Durant molts anys es considerava que el cor era un òrgan format per cèl.lules terminals i diferenciades sense capacitat regenerativa. La mort cel.lular era l'únic procés al qual s'hi atribuïa un paper en la patogènia de les malalties que cursaven amb lesió miocàrdica, considerant que el cor no tenia capacitat de reparació o compensació enfront l'insult més enllà de la hipertròfia. Qualsevol malaltia que comportés una mínima quantitat de necrosi miocàrdica persistent era susceptible de finalitzar amb la viabilitat de l'òrgan en poc temps. (15).

Troballes més recents indiquen que en el cor adult humà existeix una població de cèl.lules miocàrdiques amb el potencial i les característiques de les cèl.lules mare progenitores (*stem cells*) i, per tant, amb capacitat regenerativa (15, 22, 23). Aquesta evidència ha canviat totalment el concepte d'homeostasi cardíaca i, per tant, al ja conegut fenomen de mort cel.lular, s'hi ha d'afegir el de potencial regeneració. Aquest procés de regeneració miocàrdica pot donar-se per dues vies:

- Per una banda, la diferenciació de cèl.lules primàries a miòcits inmadurs (mioblastes) que es divideixen de dos a quatre cops abans de convertir-se en miocardiòcits madurs en els que s'atura el cicle cel.lular replicatiu. Aquest procés no té retorn, no existeix cap evidència que els miocardiòcits madurs puguin de-diferenciar-se, re-entrar en el cicle cel.lular i proliferar de nou (2,24).

- Una altra possible procedència dels mioblastes és la implantació miocàrdica de *stem cells* sistèmiques, fet que ha quedat demostrat en el model de trasplantament cardíac entre persones de diferent sexe (22, 23).

En aquest context, els mecanismes de regulació de necrosi, apoptosi i regeneració miocàrdica han adoptat una nova perspectiva i significat homeostàtic (15, 25, 26).

El recent coneixement de que alguns miòcits del cor adult poden entrar en cicle replicatiu, dóna suport a aquesta hipòtesi. S'ha vist que en alguns miocardiòcits ventriculars existeix expressió dels antígens de superfície indiferenciats propis de cèl·lules mare progenitores medul·lars (22, 27, 28). Aquestes cèl·lules es diferencien en diverses línies cel·lulars en el cor adult i es poden trobar en successius estadis de diferenciació: des de la més primitiva cèl·lula mare pluripotencial fins a estadis de mioblast o cèl·lula miocàrdica diferenciada. Cal destacar que aquestes cèl·lules indiferenciades que entren en procés de replicació expressen factors de transcripció específics per a miocardiòcits i tenen positivitat per als marcadors d'activació del cicle cel·lular i de la telomerasa. De tot això es desprèn la idea de que, malgrat existeixi algun percentatge de miocardiòcits que desapareix, el cor té capacitat de regeneració i no és un òrgan diferenciat terminal (29, 30-33).

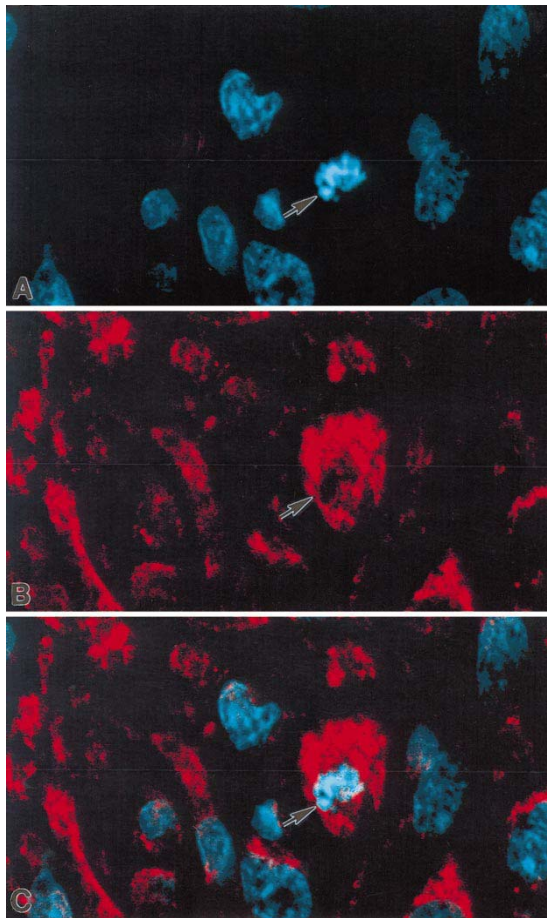
El fenomen de regeneració existeix de forma fisiològica al cor humà adult. El que no queda tant clar és quin és l'índex de regeneració dels miocardiòcits, ja que aquest està en relació a l'edat de l'individu i a la presència o absència de miocardiopatia (6, 34). En la revisió realitzada per Buja i cols es postula que el percentatge de regeneració de miocardiòcits en cors sans és de 0'0014% (14 miòcits per 1 milió), en cors en situació de fallida cardíaca terminal és de 0'013-0'015% i en les zones adjacents a àrees necrosades després d'un infart de miocardi és de 0'03% (6). L'estudi realitzat

per Bergmann i cols emprant la integració del carboni 14 en el DNA dels individus va permetre inferir que els miocardiòcits es renoven un 0'2-2% anualment, decrementant el percentatge a mesura que l'individu va envellint. Així, el percentatge anual de regeneració miocàrdica als 25 anys és d'un 1% i als 75 anys és d'un 0'45%, essent l'edat global dels miocardiòcits uns 6 anys menys que l'edat de l'individu (34).

Per tant, amb les dades obtingudes de tots aquests estudis, no hi ha dubte de l'existència de regeneració miocàrdica en el cor adult; la qüestió és escollir un marcador de la mateixa tenint en compte les característiques fisiopatològiques de l'individu com són l'edat, si és sa o no, alcohòlic o no, hipertens o no, afecte de cardiopatia isquèmica o no, afecte d'arterioesclerosi o no, ja que aquest índex de regeneració és susceptible de ser modificat.

Existeixen marcadors de regeneració miocàrdica i es poden classificar en: morfològics (figures de mitosis, cariorrexis), immunohistoquímics (positivitat nuclear per a l'antigen Ki67) i mol.leculars (activitat de l'enzim telomerasa).

Anversa i cols foren els pioners en la visualització de figures de mitosi en el miocardi adult humà mitjançant la microscopia confocal, en individus afectes de cardiopatia isquèmica i insuficiència cardíaca en fase terminal (figura 7). Tot i que l'índex mitòtic evidenciat fou baix això no implica que tingui un paper marginal en la regeneració de miocardiòcits (2).

Figura 7. Mitosi en un miòcit del ventricle esquerre en un pacient afecte de cardiopatia isquèmica

Els cromosomes de la metafase (fletxes) s'il·lustren per fluorescència blava (A). Els miòcits són reconeguts per fluorescència vermella d'un anticòs per a actina sarcomèrica del citoplasma (B). En combinar aquestes dues imatges es demostra la localització de la mitosi en el miòcit (C). Augment original x 1400 (per microscopia confocal). Figura extreta de l'article de Anversa i cols. *Circ Res.* 1998 Jul 13;83(1):1-14.

L'índex nuclear de positivització pel marcador Ki67 i la quantificació i expressió de l'enzim telomerasa s'han utilitzat com a marcadors fiables de proliferació miocàrdica (29), recomanant sempre utilitzar més d'un tipus de marcador a l'hora de fer estudis (29, 35).

El Ki67 és un antigen que s'expressa al nucli cel·lular només quan aquesta es troba dins el cicle, pel que es considera un marcador de divisió i replicació cel·lular; no s'ha trobat expressió de l'antigen Ki67 en cèl·lules fora del cicle cel·lular. Des de fa

anys és ben coneguda la seva utilitat com a marcador d'índex de replicació de les cèl·lules tumorals (36).

Durant els darrers anys s'han publicat diferents treballs que avalen el seu ús com a marcador de regeneració miocàrdica ja que s'expressa en miòcits que són dins el cicle cel·lular en un moment determinat i que, per tant, tradueixen l'existència de proliferació miocàrdica (1, 17, 37) (Figura 8).

Figura 8. Miòcits en procés de divisió en un cor humà afecte d'insuficiència cardíaca.

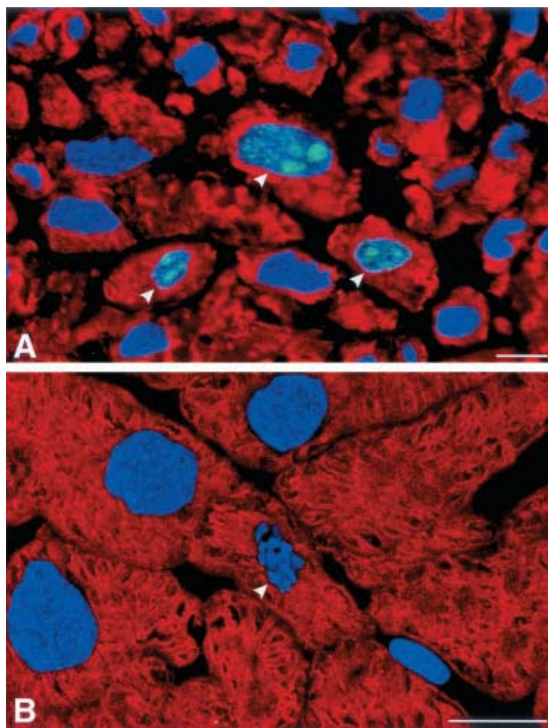


Figura A. Positivitat per a l'antigen nuclear Ki67 que s'il·lustra amb fluorescència blava (fletxes). La fluorescència vermella correspon a la tinció de les cadenes pesades de la miosina cardíaca.

Figura B. La fluorescència blava reflexa la tinció dels cromosomes en la metafase. Imatge per microscopia confocal.

Figura extreta de l'article de Nadal-Ginard i cols. *Circulation Research* 2003;92:139-50.

La telomerasa és una DNA polimerasa constituïda per dues subunitats: RNA + telomerase-RT (TERT) la missió de la qual consisteix en mantenir la longitud de les telomeres i, així, donar estabilitat cromosòmica a la cèl.lula (figura 9).

Figura 9. Subunitats de l'enzim telomerasa

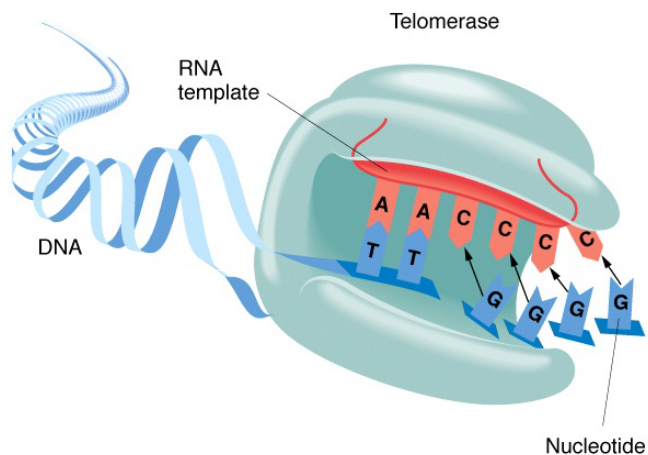


Figura on s'il.lustra l'estructura de l'enzim telomerasa amb les seves dues subunitats: RNA + telomerase-RT . Figura cortesia de www.mol-biol4masters.masters.grkraj.org

Les telomeres són els extrems finals dels cromosomes i la seva longitud és un paràmetre clau per a l'estabilitat dels mateixos ja que protegeix els cromosomes dels fenòmens de degradació i recombinació mol.lecular. Si l'activitat de la telomerasa disminueix, la longitud de les telomeres s'escurça fins a assolir una mida crítica en la que s'activen els mecanismes d'apoptosi que condueixen a la mort cel.lular. Aquest procés té lloc de forma fisiològica en l'envelliment de l'individu, explicant l'aparició de fenòmens com la insuficiència cardíaca, la infertilitat i la pèrdua de la massa muscular (38). Per contra, aquest enzim, la telomerasa, exhibeix una gran activitat durant l'embriogènesi en les stem cells, en les cèl.lules progenitores i en els limfòcits activats, essent un marcador de replicació i divisió cel.lular (32).

Per altra banda, la seva elevada activitat en les cèl·lules tumorals les hi confereix una inestabilitat cromosòmica que queda reflectida en una gran capacitat replicativa i en la seva immortalitat.

L'expressió de Ki67 està incrementada en els miocardiòcits-*stem cells* adjacents a una zona necrosada per isquèmia (1) així com l'activitat de TERT; en canvi, trobem un escurçament de les telomeres en els miòcits de pacients afectes de cardiopatia hipertròfica, cardiopaties dilatades greus en fase terminal, pacients ancians (31) i també en aquells afectes d'hipertrofia ventricular secundària a estenosi aòrtica de més de 3 anys d'evolució (39). En tots aquests casos l'escurçament de les telomeres activa els mecanismes d'apoptosi que, al seu torn, estimulen l'expressió de TERT com a mecanisme compensador.

3.2.6.- La miostatina

La miostatina (inicialment denominada GDF-8, *growth/differentiation factor-8*) és una molècula que pertany a la família dels factors transformadors de creixement cel·lular tipus beta (*Transforming Growth Factor- β*) essent la seva principal missió la regulació negativa del creixement muscular (40, 41).

La seva acció és molt rellevant durant el període de vida intrauterina de l'individu, però també s'ha demostrat la seva acció, encara que en menor mesura, en el període post-natal i en l'individu adult. El múscul esquelètic es l'òrgan diana d'aquest factor de creixement, tot i que també s'ha descrit presència de RNAm de miostatina al cor (41), al teixit adipós, a la glàndula mamària i a les cèl·lules hematopoietiques (40).

Diferents estudis han demostrat el seu paper en la supraregulació negativa per a diferents factors de proliferació cel·lular, i positiva pel que fa a l'activació de l'apoptosi

en el múscul esquelètic. D'aquesta manera, l'increment de la seva activitat s'ha relacionat amb la disminució de la replicació i de la diferenciació de mioblastes, amb la conseqüent pèrdua de massa muscular. Per tot això, és un factor a tenir en compte en els processos que impliquen tant pèrdua de massa com regeneració muscular (42-44).

Estudis in vitro demostren que la miostatina inhibeix la proliferació i la diferenciació del mioblaste. Per altra banda, afavoreix els fenòmens d'apoptosi i pèrdua de proteïnes però malgrat aquests efectes, en realitat sembla ser que actua com a factor de supervivència durant el procés de transformació dels mioblastes a microtúbuls. Aquest darrer efecte l'aconsegueix fent sortir la cèl.lula del cicle cel.lular de forma irreversible i adquirint, en part, un fenotip de resistència a l'apoptosi (40).

Estudis experimentals en musculatura esquelètica, suggereixen que l'expressió de miostatina s'incrementa en el miòcit si hi ha una exposició a l'etanol (45).

Com es comenta anteriorment, s'ha detectat presència de RNAm de miostatina al cor, però el seu efecte és poc conegut (40, 41). El treball realitzat per Sharma et al mostra un increment considerable d'expressió de miostatina en els miocardiòcits existents al voltant d'un àrea necrosada post-infart. Per tant, sembla que la miostatina podria tenir un paper en tot el procés de recuperació després d'un infart de miocardi (46).

Tots els treballs que s'han anat publicant els darrers anys il.lustren la poca coneixença de l'efecte de la miostatina sobre el miocardi i la controvèrsia de les troballes d'aquests estudis. Per una banda, es postulla que la miostatina inhibeix la proliferació i decrementa la massa muscular cardíaca (47, 48) i que en cas de que es bloquegi la seva activitat, es causa un increment de la massa muscular amb hipertròfia i

hiperplàsia dels miòcits i, per tant, amb un augment de la proliferació i de la diferenciació dels miocardiòcits (41). En canvi, el treball publicat per Cohn i cols conclou que la miostatina no regula la hipertròfia ni la fibrosi miocàrdiques (49).

El treball de Wang i cols del 2008 aporta més llum a l'efecte de la miostatina sobre el miocardi, demostrant que sí actua com a regulador negatiu del creixement cel·lular, protegint el miocardi d'un excés d'hipertròfia (50).

Totes aquestes troballes ens permeten intuir que la miostatina forma part d'una xarxa de mecanismes reguladors i suprareguladors molt complexe i que requereix un estudi més profund.

3.3. LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA

L'alcohol és un tòxic que, si se'n realitza una ingesta excessiva, pot produir disfuncions en diversos òrgans en l'ésser humà. Es considera un consum excessiu d'alcohol aquell que és superior a 60 g/d en homes i més de 40 g/d en dones.

A part de ser causant d'una miocardiopatia, motiu d'estudi d'aquesta tesi, l'alcohol també té altres efectes sobre el sistema cardiovascular: afavoreix l'aparició d'arítmies cardíques (51-58) i HTA (59-63) i té un efecte protector en el desenvolupament de malaltia coronària (64-69). Aquest tòxic també produeix afectació a nivell hepàtic (esteatosi, cirrosi i hepatocarcinoma), cerebral (demència, quadres psiquiàtrics), miopatia esquelètica, neuropatia perifèrica i desnutrició calòrico-proteïca (70).

Tot i la disparitat de troballes en els estudis realitzats inicialment sobre miocardiopatia (MCP) alcohòlica (71-74), hi ha un acord en considerar que la mínima dosi acumulada d'alcohol ingerida per a desenvolupar MCP alcohòlica és de 7kg i 5kg

d'etanol per kg de pes corporal en homes i en dones respectivament. A part de la quantitat d'alcohol consumida, el temps durant el qual es sosté aquest consum també té un pes rellevant, fixant-se un mínim de 10 anys (75, 76).

La MCP alcohòlica és la causa més freqüent de miocardiopatia adquirida al món occidental després de la isquèmica. Representa fins a un 3'8% de totes les causes de miocardiopatia (77) i afecta fins un 13% dels consumidors excessius d'alcohol al nostre medi (76, 78). Comporta una elevada morbi-mortalitat en aquest col·lectiu degut al potencial desenvolupament d'arítmies, disfunció ventricular i mort sobtada, afectant fins un 10% de pacients/any quan mantenen un consum excessiu d'alcohol (79).

S'ha corroborat la influència de la susceptibilitat personal i genètica en la inducció d'aquesta malaltia, objectivant que les dones són més sensibles que els homes a desenvolupar lesions funcionals miocàrdiques a dosis similars de consum (80, 81). També s'ha vist que alguns genotips, com el "DD" del gen de l'enzim convertidor de l'angiotensina, incrementen fins a 16 cops el risc de desenvolupar disfunció ventricular per alcohol (82).

La patogènia de la MCP alcohòlica és complexa i multifactorial: s'ha corroborat una relació dosi-depenent entre el consum acumulat i l'establiment de lesió funcional i estructural miocàrdica (76), sobretot amb la necrosi dels miocardiòcits (83). Aquest efecte és independent de l'estat nutricional del pacient i d'altres aspectes ambientals.

Els principals mecanismes responsables de la inducció de dany miocàrdic per alcohol són l'alteració de la transducció de senyals intracel·lulars calci-depenents, l'alteració oxidativa i energètica a nivell mitocondrial i la disrupció de la síntesi proteica (16, 84-86). Alguns autors també parlen de les alteracions del metabolisme del

glucogen i la disregulació del sistema neurohormonal. A més, s'ha evidenciat que el desenvolupament d'apoptosi miocàrdica és un factor a tenir en compte en els processos de pèrdua de massa miocàrdica en consumidors crònics d'alcohol.

A continuació es donen més detalls sobre cadascun d'aquests mecanismes fisiopatològics:

- Alteració de la síntesi de les proteïnes contràctils: l'alcohol disminueix la síntesi de les proteïnes contràctils, probablement com a conseqüència de la degradació del DNA. Aquest fet s'acompanya d'una disminució de l'activitat de l'ATP (83, 87-90).
- Alteració transducció de senyals intracel·lulars calci-depenents: aquest és un dels principals mecanismes fisiopatològics de la MCP alcohòlica. L'alcohol interacciona amb la composició de les membranes cel·lular, mitocondrial i del reticle sarcoplàmic, alterant així el metabolisme i el flux intracel·lular de calci i, en conseqüència interferint en els processos de contracció-relaxació musculars (16, 83, 91-97).
- Alteració estrès oxidatiu: l'alcohol produeix un decrement de l'estat oxidatiu amb un consegüent augment de radicals lliures que indueixen dany muscular (Muscle&Nerve 2004). De totes formes, sembla que l'alteració de l'estat oxidatiu cel·lular en la MCP alcohòlica és més una conseqüència que no pas una causa de lesió miocàrdica, segons conclou l'estudi de Fatjó i cols (16).
- Disfunció mitocondrial: l'alcohol produeix una alteració de la cadena respiratòria mitocondrial, dels fluxes de calci i disminueix la síntesi de les

proteïnes mitocondrials (98, 99). Tot això es tradueix en aparició d'edema, augment de tamany i vacúols intramitocondrials (83).

- Inducció de l'apoptosi: mecanisme ja comentat àmpliament en apartats anteriors. Val la pena destacar el treball de Fatjó i cols titulat "Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy", on es compara l'índex apoptòtic (IA) entre mostres de miocardi obtingudes de pacients alcohòlics, pacients hipertensos i controls sans. L'IA no varia entre els alcohòlics i hipertensos però si s'analitzen tots els miocardiopàtics independentment de la seva causa de MCP es mostra que l'IA és superior en tots els miocardiopàtics respecte els controls sans. Es conclou, així, que l'apoptosi és un fenomen present tant en els pacients afectes d'HTA com en els que presenten un consum excessiu d'alcohol amb uns IA similars; el grau d'apoptosi està en relació amb el grau de lesió estructural més que no pas en l'origen de la miocardiopatia (100).
- Alteracions del metabolisme del glucogen: mecanisme documentat en la miopatia alcohòlica esquelètica (83), però que no ha demostrat tenir una clara relació amb el desenvolupament de la MCP alcohòlica (101).
- Sistema neurohormonal: hi ha alguns treballs que han demostrat un augment en l'eliminació urinària de norepinefrina i epinefrina relacionant aquests nivells amb les mesures morfomètriques cardíques, suggerint que aquestes catecolamines juguen un paper destacat en la gènesi de la hipertròfia induïda per alcohol (102-104). En aquesta línia, alguns autors han demostrat un augment en l'activació de receptors alfa1-adrenèrgics que estimula la hipertròfia dels miòcits (105).

Tots aquests mecanismes condueixen a la necrosi del miòcit, la miocitolisi, essent aquesta la característica anatomopatològica més rellevant de la MCP alcohòlica.

Com la resta de miocardiopaties dilatades, la MCP alcohòlica es defineix per una dilatació del ventricle esquerre (VE) amb una paret del VE normal o aprimada i un augment de la massa del VE. La dilatació del VE i l'increment de la seva massa són els canvis més incipients. Posteriorment apareix la disfunció diastòlica com a signe més precoç de MCP alcohòlica subclínica. Aquesta ve definida per ecografia doppler, essent les seves troballes més rellevants una alteració de la relaxació, l'ompliment, la distensibilitat i la duresa del ventricle esquerre. Si la MCP alcohòlica progressa es produeix una disfunció sistòlica, caracteritzada per una reducció de la fracció d'ejecció del VE. Inicialment, tant la disfunció sistòlica com la diastòlica poden ser totalment asimptomàtiques. En progressar la cardiopatia comencen a aparèixer les manifestacions clíniques, que no es diferencien de les que es produeixen en les altres miocardiopaties dilatades. Apareix dispnea, inicialment amb l'exercici i en fases més avançades en repòs, juntament amb ortopnea, tos i dispnea paroxística nocturna. A mesura que empitjora el grau de cardiopatia s'evidencien signes i símptomes de fallida cardíaca dreta com són l'aparició d'edemes perifèrics, congestió hepàtica i anasarca. A més, aquests pacients afectes de MCP alcohòlica tenen major risc de desenvolupar arítmies que poden conduir a una mort sobtada (73, 74, 76, 77, 83).

El seu diagnòstic és per exclusió d'altres potencials causants de MCP dilatada i no té cap troballa histològica o immunològica específica més enllà de les que defineixen les MCP dilatades: miocitolisi, hipertròfia del miòcit i fibrosi intersticial (76).

La clínica i el tractament de la MCP alcohòlica no es diferencien de la MCP dilatada d'un altre origen. Cal remarcar que en tractar-se d'una MCP dosi-depenent, si

s'atura el consum excessiu d'alcohol pot existir una recuperació funcional miocàrdica. Quan no hi ha una aturada en el consum d'alcohol, el grup de no abstinentes presenten una mortalitat superior respecte els abstinentes (75, 106). De totes formes existeix certa dificultat per a explicar per què alguns pacients alcohòlics crònics amb un elevat grau de necrosi i apoptosi miocàrdiques, aconsegueixen establir la seva malaltia clínicament i funcional. Aquesta dada ens permet suposar que existeix una potencial capacitat de reparació del dany miocàrdic induït per l'efecte tòxic de l'alcohol. En altres casos, pacients amb MCP alcohòlica que abandonen completament el consum d'alcohol, no presenten remissió de la malaltia en la seva totalitat, el que fa pensar que aquests suposats mecanismes de reparació funcional no sempre actuen de la mateixa manera i que estan regulats per factors, com ara la miostatina, que influeixen sobre la regeneració. Per tot això, considerem que s'ha de contemplar el potencial paper que tenen els processos de regeneració miocàrdica en l'establiment del dany funcional i estructural en la MCP alcohòlica i la influència específica que el consum d'etanol o d'altres factors com l'apoptosi o la miostatina tenen sobre ells.

A més a més, la miostatina podria tenir un paper independent i significatiu en la modulació de la regeneració miocàrdica, tot i que també es podria veure influenciada directament per l'efecte tòxic de l'alcohol.

L'alcohol pot tenir efectes diferencials sobre cadascun d'aquests processos (necrosi, apoptosi i regeneració miocàrdica) i també sobre la miostatina. Per això seria important comparar l'efecte diferencial de l'alcohol amb el que es produeix en altres miocardiopaties dilatades com ara la hipertensiva.

En la MCP alcohòlica, l'estudi dels factors que influeixen en cadascun d'aquests processos (necrosi, apoptosi i regeneració) ens permetrà comprendre millor els

paràmetres de lesió funcional i estructural miocàrdica, la seva estabilitat clínica, millora o deteriorament funcional progressius, inclús amb possibilitat d'actuar terapèuticament sobre ells.

3.4. LA MIOCARDIOPATIA HIPERTENSIVA

La hipertensió arterial (HTA) és una malaltia molt freqüent a la població mundial. Pel que fa a Espanya, té una prevalença del 35% en la població adulta, incrementant-se fins al 68% en els majors de 60 anys (107).

La HTA és el principal estímul patològic causant d'hipertrofia i és el factor de risc més important que pot conduir al desenvolupament d'insuficiència cardíaca (7).

La presència d'HTA incrementa més de dos cops el risc de patir malaltia coronària i més de tres cops el risc de desenvolupar insuficiència cardíaca congestiva i de patir un ictus cerebral. Si, a més a més, hi ha hipertrofia ventricular la mortalitat d'aquestes malalties augmenta, així com el risc de patir una mort sobtada i arítmies, ja sigui arítmia completa per fibril·lació auricular (ACXFA) o arítmies ventriculars (108).

La MCP hipertensiva es defineix com a presència d'hipertrofia ventricular esquerra en absència d'estenosi aòrtica i de MCP hipertrofica en un malalt hipertens (109).

Dues tercers parts dels pacients hipertensos presenten criteris ecocardiogràfics d'hipertrofia ventricular. Aquesta cardiopatia és la primera causa d'insuficiència cardíaca en la població espanyola, especialment en les dones ancianes (109).

En una primera fase, la HTA provoca una remodelació hipertrofica del miocardi seguint un patró d'hipertrofia concèntrica. En el desenvolupament d'aquesta hipertrofia també hi influeixen altres factors com són el sexe, l'edat, la raça, l'índex de massa

corporal, els nivells de pressió arterial diastòlica i les oscil·lacions de la pressió arterial entre nit i dia (108). Aquest patró d'hipertrofia concèntrica consisteix en l'augment del gruix relatiu de la paret ventricular i de la massa cardíaca però sense alterar el volum d'aquesta cambra cardíaca. El tipus de disfunció ventricular que es produeix en aquest cas és de tipus diastòlic.

Amb el pas del temps, s'acaba produint una dilatació de l'aurícula esquerra i un deteriorament de la funció ventricular, desenvolupant-se finalment una MCP dilatada, definida amb els mateixos criteris que es comentaven en l'apartat de MCP alcohòlica i que condueix, finalment, a l'aparició d'insuficiència cardíaca de tipus sistòlic. Tant la MCP hipertensiva hipertrofica com la dilatada poden donar clínica d'insuficiència cardíaca, essent la primera de tipus diastòlic, i la segona de tipus sistòlic i també poden afavorir l'aparició d'arítmies. (7).

El diagnòstic de la MCPH es realitza com el de la resta de cardiopaties, mitjançant un estudi electrocardiogràfic, ecocardiogràfic i inclús RM cardíaca. A nivell histopatològic es troba proliferació dels miocardiocits i aparició de fibrosi per l'estimulació que es produeix dels fibroblastes, no essent aquestes troballes específiques d'aquest tipus de miocardiopatia. El que sí es considera característic de la MCP hipertensiva és l'augment de la fibrosi perivascular i l'engruiximent de la paret de les arterioles intramiocàrdiques (108).

L'apoptosi és un fenomen descrit en la MCP hipertensiva així com en la resta de miocardiopaties, considerant-se un factor clau en l'aparició d'insuficiència cardíaca (108). L'apoptosi disminueix la massa contràctil miocàrdica el que condueix a una

disfunció sistòlica. A més, a través de les caspases, provoca un dany en les proteïnes contràctils i en el citocrom C mitocondrial que condueix a un dèficit de producció d'ATP, cosa que dificulta la contracció miocàrdica (109).

L'estudi realitzat per Beaumont i cols el 2007 amb ratolins transgènics, comparà l'índex apoptòtic (IA) i la densitat miocàrdica en tres grups: hipertensos, hipertensos amb MCP i hipertensos amb MCP que havien desenvolupat insuficiència cardíaca (IC). L'IA és major en el grup de MCP amb IC, seguit pel grup de MCP i finalment el d'hipertensos solament. Per contra, la densitat miocàrdica era major en el grup d'hipertensos, seguit pel de MCP i finalment assolía els seus valors més baixos en el grup de MCP amb IC. Totes les diferències eren significatives. (109).

L'aparició de MCP hipertensiva també es relaciona amb l'alteració del dipòsit de les fibres de la matriu col·làgena. Hi ha una fibrosi difusa secundària a una excessiva síntesi de col·lagen i una disrupció excessiva al voltant del miocardiòcit conseqüència d'una degradació excessiva del col·lagen. En el primer cas, predomina la disfunció diastòlica i en el segon la disfunció sistòlica (109). Com a marcadors en plasma d'aquestes alteracions de la matriu col·làgena en destaquen dos, encara en procés d'estudi: els nivells del propèptid carboxi-terminal del procòl·lagen-I (PICP) que augmenta quan s'incrementa la síntesi de col·lagen i la metal·loproteïnasa de matriu-1 (MMP-1) i el seu inhibidor tisular (TIMP-1) que augmenten quan predomina la degradació excessiva de col·lagen. Recentment ha aparegut en aquesta escena un nou actor: una subfamília receptors nuclears anomenada receptors activats per proliferadors dels peroxisomes (PPAR-alfa). Sembla ser que contribueixen al procés de remodelació miocàrdica i de la paret vascular en cardiopaties de diferents etiologies. Si s'expressa la forma truncada de PPAR-alfa, s'afavoreix l'aparició de fenòmens apoptòtics i de fibrosi miocàrdiques,

provocant una depressió de la fracció d'ejecció i dilatació del ventricle esquerre. Els darrers estudis apunten a que el tractament amb fibrats i estatines estimulen la forma completa de PPAR-alfa produïnt així un decrement de la fibrosi miocàrdica (109).

El sistema renina-angiotensina-aldosterona té un paper clau en el desenvolupament de la MCP hipertensiva. Es considera que l'activació de la fibrosi miocàrdica es realitza a través de l'angiotensina i de l'aldosterona. Aquesta darrera és fonamental en el pas de MCP hipertròfica compensada a descompensada i, per tant, en l'aparició d'insuficiència cardíaca. S'ha investigat en aquesta línia els polimorfismes del gen de l'ECA (enzim convertidor de l'agiotensina), evidenciant que el genotip DD incrementa l'activitat de l'ECA a plasma i augmenta, en conseqüència el grau d'hipertròfia ventricular esquerra (108). Cal destacar que s'han efectuat les mateixes troballes en estudis realitzats en MCP alcohòlica (82).

En base a aquestes dades, es prescriu tractament amb IECAS i ARA-II a aquests pacients ja que així es redueix la hipertròfia del ventricle esquerre, es fa una prevenció de la remodelació del VE i es millora el pronòstic post-infart (108).

En realitat, l'afectació cardíaca per hipertensió arterial pot considerar-se part d'una síndrome que inclou una hipertròfia ventricular subjacent, malaltia coronària, activació neuroendocrina i resistència a la insulina. Moltes de les característiques de la MCP hipertensiva són secundàries a l'activació del sistema renina-angiotensina-aldosterona, a un excés de catecolamines, a una disfunció diastòlica i a la presència de malaltia arterial coronària (108). Després de totes les troballes dels darrers estudis, s'intueix clarament que la fisiopatologia de la MCP hipertensiva és complexa i multifactorial, requerint un aprofundiment en l'estudi de les alteracions de l'homeostasi cel.lular-molecular. Només

d'aquesta manera es podrà avançar en el terreny diagnòstic, terapèutic i, sobretot preventiu per a que els pacients que ja tenen hipertròfia ventricular esquerra no evolucionin a insuficiència cardíaca (109).

4. HIPÒTESI DE TREBALL

4. HIPÒTESI DE TREBALL

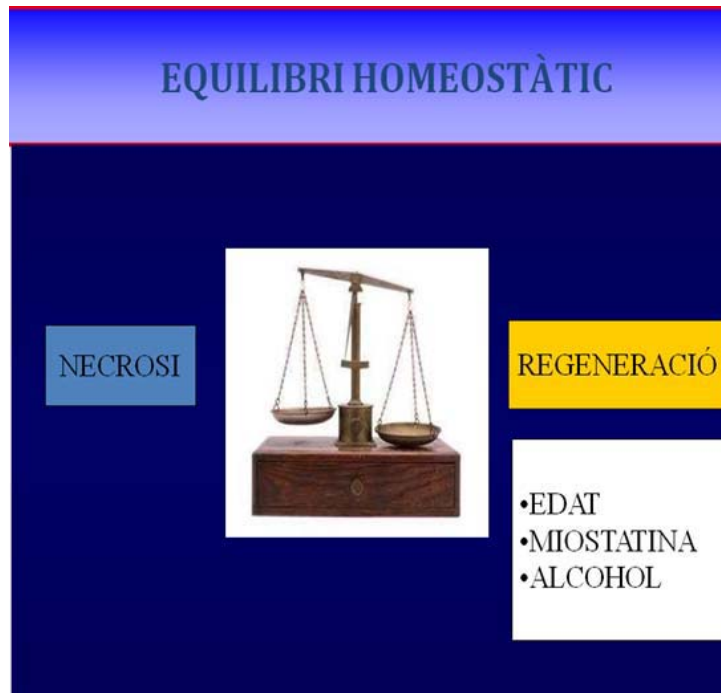
En la darrera dècada s'han fet grans avenços pel que fa al coneixement de l'homeostasi cardíaca, redescobrint aquest concepte i donant-li nous matisos. No només s'ha demostrat que en els cors malalts hi ha apoptosi i regeneració, sinó també que aquests dos fenòmens són presents de forma fisiològica en els cors sans. La gran majoria d'estudis s'han realitzat en animals i aquells que s'han fet en humans s'han dut a terme en cors afectes de cardiopatia isquèmica.

El Grup de Recerca de Malalties Relacionades amb l'Alcohol i Patologia Muscular, pertanyent al Servei de Medicina Interna i al grup de Neurociències IDIBAPS (Grup de treball 7.04) porta molts anys investigant sobre els efectes d'aquest tòxic en l'organisme humà. Pel que fa a la miocardiopatia alcohòlica, ha quedat demostrat en diversos treballs d'aquest grup i en d'altres, que la seva etiologia és multifactorial destacant-ne les alteracions que es produeixen al miòcit, la disfunció dels mitocondris, les alteracions de les proteïnes contràctils i del metabolisme del calci, els trastorns de la cadena oxidativa, les alteracions metabòliques i la disregulació del sistema neurohormonal. També està clarament demostrada la importància de l'activació de l'apoptosi.

Malgrat tots aquests estudis hi ha aspectes encara no prou aclarits, com ara la diferent evolució funcional i clínica pel que fa al desenvolupament de la MCP alcohòlica dels pacients alcohòlics crònics amb un mateix grau de consum. Així, no tots els malalts que consumeixen una mateixa quantitat d'alcohol presenten el mateix grau de lesió miocàrdica. Per tant, és possible que a part dels factors de lesió miocàrdica dosi-dependents de l'alcohol hi hagi altres factors de reparació o regeneració miocàrdica que compensin en part aquest grau de lesió. D'aquesta manera s'establiria un equilibri

entre lesió i regeneració que podria variar en cada individu amb consum excessiu d'alcohol segons el mecanisme predominant (veure figura 10).

Figura 10. Homeostasi miocàrdica. Per al manteniment de l'homeostasi miocàrdica és necessari l'equilibri entre necrosi i regeneració cel·lulars. Aquest equilibri es pot veure influenciat per múltiples factors com ara l'edat, l'acció de tòxics com l'alcohol i proteïnes com la miostatina.



Aquest fet, juntament amb les novetats descrites en l'homeostasi miocàrdica i la possibilitat de poder estudiar tots aquests fenòmens en miocardis humans gràcies a l'ampli banc que el grup ha creat en els darrers 15 anys, ens van conduir a elaborar la nostra hipòtesi de treball.

Aquesta tesi es centra en l'estudi de la regeneració miocàrdica en els malalts alcohòlics i la seva relació amb el dany funcional i estructural miocàrdic.

Per una banda, avaluem el fenomen de regeneració miocàrdica en la MCP alcohòlica, postulant que a major grau d'afectació miocàrdica hi haurà més regeneració com a mecanisme compensador. En aquest treball s'empren dos marcadors de regeneració d'utilitat contrastada en estudis previs realitzats sobre altres tipus de

miocardiopaties, com són l'expressió de l'antigen nuclear Ki67 i de l'enzim telomerasa i en comparem la seva utilitat.

Per altra banda, aquesta tesi postula que la regulació dels fenòmens de regeneració i apoptosi en la MCP alcohòlica pot estar influenciada per la miostatina, pel que s'estudia la seva expressió en totes les mostres; aquesta podria tenir un paper independent tot i que també podria veure's influenciada directament per l'efecte tòxic de l'alcohol.

Finalment es fa una correlació entre els resultats obtinguts de l'estudi de regeneració, d'apoptosi i de l'expressió de miostatina. Aquesta tesi pretén demostrar que l'alcohol té un efecte propi i diferencial en aquests processos de regeneració, apoptosi i expressió de miostatina, pel que es comparen els resultats obtinguts en el grup d'alcohòlics amb els de mostres de pacients afectes d'HTA.

Creiem que en la MCP alcohòlica, l'estudi dels factors que influeixen en els processos d'apoptosi i regeneració ens permetrà comprendre millor els paràmetres de lesió funcional i estructural miocàrdica, la seva estabilitat clínica, millora o deteriorament funcional progressiu, inclús amb la possibilitat d'actuar terapèuticament sobre ells.

En resum, la present tesi postula com a HIPÒTESI DE TREBALL que:

1. En els pacients amb MCP alcohòlica amb major grau de lesió miocàrdica, existeix un cert grau de regeneració miocàrdica que actua com a mecanisme compensador.
2. La miostatina té un efecte regulador sobre l'apoptosi i la regeneració en la MCP alcohòlica.

3. L'acció de la miostatina es pot veure influenciada de forma directa per l'efecte tòxic de l'alcohol, que n'incrementa la seva activitat.
4. L'alcohol té un efecte propi directe sobre els fenòmens d'apoptosi i regeneració i sobre l'expressió de miostatina al miocardi: actua com a potenciador de l'apoptosi, inhibidor de la regeneració i, a més, regula l'expressió de la miostatina que influeix sobre l'apoptosi i la regeneració.

5. OBJECTIUS DE TREBALL

5. OBJECTIUS DE TREBALL

Aquest estudi es du a terme en mostres d'explants miocàrdics humans obtinguts durant el procés de donació d'òrgans per a trasplantament. Amb aquestes mostres es realitza un estudi cas-control els objectius del qual són:

1. Estudi de la presència de regeneració miocàrdica mitjançant:

A.- L'estudi immunohistoquímic de l'antigen nuclear Ki67.

B.- La quantificació de l'activitat telomerasa amplificada per PCR (protocol TERT).

2. Estudi de la presència d'apoptosi miocàrdica mitjançant la tècnica immunohistoquímica TUNEL.

3.- Valoració immunohistoquímica de l'activitat miostatina com a factor regulador de la regeneració miocàrdica.

4.- Correlació dels paràmetres de regeneració miocàrdica amb:

4.1.- Paràmetres de consum d'alcohol: comparació amb un grup d'hipertensos no consumidors d'alcohol i amb un grup de controls sans.

4.2.- Funció ventricular i grau de miocardiopatia dels grups.

4.3.- Presència d'apoptosi miocàrdica.

4.4.- Activitat miocàrdica de miostatina.

6. TREBALLS PUBLICATS

6. TREBALLS PUBLICATS

6.1. INCREASED MYOSTATIN ACTIVITY AND DECREASED MYOCYTE PROLIFERATION IN CHRONIC ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY.

Fernández-Solà J, Lluís M, Sacanella E, Estruch R, Antúnez E, Urbano-Márquez A.

Alcoholism: Clinical and Experimental Research (Acceptat. In Press).

6.2. EVALUATION OF MYOCYTE PROLIFERATION IN ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY. TELOMERASE ENZYME ACTIVITY (TERT) COMPARED TO Ki-67 EXPRESSION.

Lluís M, Fernández-Solà J, Castellví-Bel S, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Márquez A.

Alcohol and Alcoholism (Acceptat. In Press).

6.1. INCREASED MYOSTATIN ACTIVITY AND DECREASED MYOCYTE
PROLIFERATION IN CHRONIC ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY.

Fernández-Solà J, Lluís M, Sacanella E, Estruch R, Antúnez E, Urbano-Márquez A.

Alcoholism: Clinical and Experimental Research (Acceptat. In Press).

6.1. RESUM DEL TREBALL *INCREASED MYOSTATIN ACTIVITY AND DECREASED MYOCYTE PROLIFERATION IN CHRONIC ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY.*

Objectius: l'apoptosi és un procés que intervé en el dany miocàrdic produït per l'alcohol, conduint al desenvolupament d'una cardiopatia. La proliferació miocàrdica pot compensar aquesta pèrdua de miòcits. La miostatina està suprarregulada en produir-se un dany miocàrdic i en relació al consum d'alcohol, decrementant així la renovació dels miòcits. En aquest treball avaluem el potencial paper de l'alcohol en la inducció de l'apoptosi miocàrdica així com en la inhibició de la proliferació dels miòcits.

Mètodes: es varen obtenir mostres miocàrdiques de donants d'òrgans, incloent 22 donants amb consum abusiu d'alcohol, 22 hipertensos, 8 afectes d'altres causes de cardiopatia i 10 donants sans. La seva avaluació va incloure un registre del consum diari, recent i acumulat d'alcohol, radiografia de tòrax, funció ventricular mitjançant una ecocardiografia bidimensional i un examen histològic i immunohistoquímic del ventricle esquerre. El grau d'apoptosi es va avaluar mitjançant les tècniques immunohistoquímiques TUNEL, BAX i BCL-2. El grau de proliferació miocàrdica es va mesurar amb l'expressió de l'antigen nuclear Ki-67. L'activitat de la miostatina es va avaluar amb un estudi immunohistoquímic específic. La presència de cardiopatia es va avaluar per criteris histològics i funcionals.

Resultats: els donants alcohòlics i hipertensos afectes de cardiopatia mostraren un índex apoptòtic major que els respectius dels seus grups sense cardiopatia associada. L'activitat de la miostatina va ser major en els donants alcohòlics que en els controls sans, principalment en aquells afectes de cardiopatia. L'increment en l'expressió de miostatina fou major en els alcohòlics amb cardiopatia que en els altres grups.

L'expressió de ki-67 fou major en tots els grups afectes de cardiopatia respecte els grups sense cardiopatia, essent els alcohòlics els qui mostraren un menor increment de resposta proliferativa.

Conclusions: l'alcohol induïx una pèrdua de miòcits a través de l'apoptosi però també inhibeix, en part, la proliferació miocàrdica gràcies a la supraregulació de la miostatina. El resultat final comporta un desequilibri de l'homeostasi miocàrdica amb una pèrdua neta de la massa total de miòcits i una progressiva disfunció ventricular.

6.2. EVALUATION OF MYOCYTE PROLIFERATION IN ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY. TELOMERASE ENZYME ACTIVITY (TERT) COMPARED TO Ki-67 EXPRESSION.

Lluís M, Fernández-Solà J, Castellví-Bel S, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Márquez A.

Alcohol and Alcoholism (Acceptat. In Press).

6.2. RESUM DEL TREBALL *EVALUATION OF MYOCYTE PROLIFERATION IN ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY. TELOMERASE ENZYME ACTIVITY (TERT) COMPARED TO Ki-67 EXPRESSION.*

Objectiu: El cor ha estat considerat clàssicament un òrgan amb una diferenciació terminal, però estudis recents han evidenciat una resposta proliferativa dels miòcits

envers algunes agressions. Un consum excessiu d'alcohol indueix el desenvolupament d'una cardiopatia a través de l'apoptosi dels miòcits. En aquest treball s'ha avaluat la resposta proliferativa miocàrdica en donants alcohòlics afectes de cardiopatia, comparant l'activitat de l'enzim telomerasa (TERT) amb l'expressió de l'antigen nuclear Ki-67.

Mètodes: es varen obtenir mostres de teixit miocàrdic de donants d'òrgans de forma prospectiva. Es varen incloure donants amb 1) elevat consum d'alcohol acumulat (n=15), 2) hipertensió arterial de llarga evolució (n=14), 3) altres causes de cardiopatia (valvular, coronària o idiopàtica) (n=8), i 4) donants sans (n=6). Els grups 2 i 3 foren subdividits en funció de la presència de cardiopatia. S'avaluaren paràmetres de consum d'alcohol, funció ventricular per radiografia de tòrax i ecocardiografia bidimensional i estudis histològics i immunohistoquímics. El grau de proliferació miocàrdica fou avaluat amb l'estudi d'expressió de l'antigen nuclear Ki-67 i mesurant l'activitat de TERT per PCR en temps real.

Resultats: es van incloure 43 donants en l'estudi, estant 35 d'ells afectes de cardiopatia. L'activitat de l'antigen nuclear Ki-67 va ser baixa en els controls sans i significativament incrementada en els altres grups, principalment en els afectes de cardiopatia. Els donants alcohòlics amb cardiopatia presentaren un menor grau de resposta proliferativa respecte que els altres grups afectes de cardiopatia, essent les diferències no significatives. No es va detectar proliferació en cap cas mesurant l'activitat de TERT.

Conclusions: en els donants afectes de cardiopatia, independentment de la seva causa, es detectà un increment de l'activitat de Ki-67 en els miòcits. Els donants alcohòlics presentaren, de forma no significativa, una menor capacitat de resposta proliferativa en comparació amb els altres grups afectes de cardiopatia. L'activitat de TERT no ha

resultat un bon marcador de resposta proliferativa miocàrdica en aquest model. L'expressió de l'antigen nuclear Ki-67 ha resultat un millor marcador que l'activitat de TER per a mesurar la proliferació miocàrdica en la cardiopatia induïda per l'alcohol.

7. RESUM DE RESULTATS

7. RESUM DE RESULTATS

Durant un període de 4 anys (gener 2003-desembre 2006) el nostre grup d'Alcoholologia va estudiar cors de pacients en mort cerebral ja fos conseqüència d'un event traumàtic o cerebrovascular i que havien estat valorats per l'equip de transplantament de l'Hospital Clínic de Barcelona i considerats aptes per a ser donants d'òrgans. Per a la realització d'aquests dos treballs, que estan interrelacionats, es valoraren un total de 62 mostres de donants d'òrgans que complien els criteris de selecció. Es varen classificar en donants alcohòlics, donants hipertensos i controls sans. Els dos primers grups de donants foren subdividits en funció de la presència o absència de cardiopatia quedant els grups conformats de la següent manera:

1- Consumidors d'alcohol a altes dosis: 22 donants

- amb cardiopatia: 12 donants
- sense cardiopatia: 10 donants

2- Hipertensos essencials de llarga evolució sense consum d'alcohol: 22 donants

- amb cardiopatia: 13 donants
- sense cardiopatia: 9 donants

3- Afectes d'altres causes de cardiopatia: 8 donants (3 de tipus isquèmic, 3 de tipus idiopàtica i 2 de tipus valvular).

4- Controls sans: 10 donants.

En tots els donants s'avaluà el grau d'apoptosi, de regeneració i d'expressió de miostatina, obtenint els següents resultats:

1. ESTUDI DE L'APOPTOSI MIOCÀRDICA

Es va realitzar un estudi de l'activitat apoptòtica en totes les mostres mitjançant les tècniques immunohistoquímiques TUNEL, BAX i BCL-2.

En analitzar l'índex apoptòtic miocàrdic en tots els casos i controls mitjançant l'estudi immunohistoquímic TUNEL, no es trobaren diferències significatives intergrupals. Per contra, l'expressió de TUNEL fou significativament major en alcohòlics amb cardiopatia respecte els alcohòlics sense cardiopatia, en canvi dins dels hipertensos no s'evidenciaren diferències significatives entre els afectes de cardiopatia i els no afectes de cardiopatia.

L'expressió de BAX (marcador pro-apoptòtic) estava incrementada en els alcohòlics i en els hipertensos respecte el grup control, essent les diferències significatives en ambdós casos. Dins el grup d'alcohòlics, aquells afectes de MCP alcohòlica presentaren una major expressió de BAX respecte els no miocardiopàtics, essent les diferències significatives. Dins el grup d'hipertensos s'evidencià el mateix fenomen entre els afectes de MCP i els que no.

Pel que fa als valors de BCL-2 (marcador anti-apoptòtic) trobarem que la seva expressió era significativament major en els grups de donants alcohòlics, hipertensos i dels afectes d'altres cardiopaties respecte el grup de controls sans. Els subgrups afectes de cardiopatia, ja fos d'origen enòlic o hipertensiu, mostraren una major expressió de BCL-2 respecte els no afectes de MCP, essent les diferències significatives.

Els alcohòlics amb MCP alcohòlica foren el subgrup amb el quocient BCL2/BAX més baix.

2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT MIOCÀRDICA DE MIOSTATINA

Es va realitzar un estudi immunohistoquímic sobre teixit miocàrdic per a avaluar el paper de la miostatina en la miocardiopatia alcohòlica.

El grup dels donants alcohòlics presentà un increment significatiu de la reactivitat perinuclear de miostatina respecte el grup de controls sans. Aquestes diferències no s'observaren en els donants dels grups d'hipertensos ni el d'afectes d'altres cardiopaties respecte els controls sans. L'activitat de miostatina fou significativament més alta en tots els donants afectes de cardiopatia, ja fos aquesta d'origen enòlic, hipertensiu o d'altres, respecte els no afectes de cardiopatia.

Per a verificar l'especificitat de l'anticòs emprat en la tècnica immunohistoquímica, es va realitzar un control negatiu amb un ratolí *myostatin knockout*.

3. ESTUDI DE LA REGENERACIÓ MIOCÀRDICA

Per a estudiar la capacitat regenerativa del miocardi, es van emprar dos marcadors: l'expressió de l'antigen nuclear Ki-67 i l'activitat de l'enzim telomerasa (TERT).

3.1. Expressió de Ki67

Es va detectar alguna reactivitat perinuclear per a Ki67 en controls sans, reflectint així un cert grau de proliferació miocàrdica basal. El grup de donants alcohòlics, el d'hipertensos i el d'afectes d'altres cardiopaties mostraren una significativa major expressió de Ki67 respecte els controls sans. En analitzar els subgrups de pacients alcohòlics, trobarem que l'expressió de Ki67 era significativament més alta en aquells donants afectes de cardiopatia en comparació amb els no miocardiopàtics. Pel que fa al grup de donants hipertensos, aquells afectes de cardiopatia també mostraren un

increment de l'expressió de Ki67 respecte els no afectes de cardiopatia, tot i que de manera no significativa. Així, la presència de cardiopatia, fos quina fos la seva causa, es mostrà com un factor independent clau en l'increment de l'expressió nuclear miocàrdica d'aquest antigen. En comparar tots els donants amb cardiopatia, els alcohòlics foren els que van evidenciar un menor increment de l'expressió de Ki67, seguits pels hipertensos i finalment pels afectes d'altres tipus de cardiopaties, sense ser significatives aquestes diferències.

3.2. Expressió de TERT

En cap de les mostres analitzades es va documentar expressió de TERT. En realitzar l'amplificació del gen cas i control per PCR en temps real, s'obtingué una clara expressió del gen control (TBP) en totes les mostres. En canvi, en cap mostra s'evidencià expressió significativa del gen TERT. Per tal de corroborar aquestes troballes, s'analitzaren tres mostres de cada especimen per TBP i TERT, obtenint els mateixos resultats. A més, es realitzaren controls positius sobre teixit procedent d'adenocarcinomes de còlon, obtenint expressió de TERT. D'aquesta manera s'assegurà que el resultat negatiu obtingut era real i no pas fruit d'un error o d'una limitació de la tècnica.

8. DISCUSSIÓ

8. DISCUSSIÓ

L'alcohol és un tòxic multisistèmic amb un marcat tropisme per lesionar les cèl·lules miocàrdiques de manera dosi-dependent. Diversos autors han plantejat que la fisiopatologia de la MCP alcohòlica és multifactorial i complexa (76, 77, 79, 81, 82, 100). Estudis previs han corroborat clarament el paper de l'alcohol en la inducció d'apoptosi i mecanismes de mort cel·lular en els miocardiòcits (86, 100). Tot i que s'ha descrit un efecte dosi-dependent entre grau d'alcohol consumit i aparició de disfunció ventricular esquerra, no tots els alcohòlics acaben desenvolupant una miocardiopatia dilatada. En conseqüència, individus amb un consum d'alcohol acumulat similar poden exhibir diferents graus de disfunció ventricular. Per tant, és lògic pensar que a més del conegut efecte tòxic de l'alcohol que indueix els fenòmens d'apoptosi, necrosi i pèrdua cel·lular, és possible que existeixin d'altres mecanismes que influeixin en el desenvolupament del dany funcional i estructural miocàrdic (80, 82, 114).

Tot i que clàssicament s'havia afirmat que el cor era un òrgan diferenciat terminal sense capacitat proliferativa, troballes d'estudis recents evidencien l'existència d'un cert grau de proliferació miocàrdica tant de forma fisiològica en subjectes sans com en situacions patològiques. Aquest fet ens ha permès considerar la possibilitat de que existeixin mecanismes de reparació miocàrdica que podrien modular el grau de dany ventricular induït per l'alcohol. Els conceptes de plasticitat i homeostasi cardíques impliquen un equilibri entre els processos d'apoptosi i regeneració miocàrdica que sovint actuen de forma sincrònica (6,15). De fet, probablement la mateixa mort cel·lular activaria els mecanismes de regeneració (115).

El treball realitzat en el decurs d'aquesta tesi evidencia que hi ha un increment d'expressió de l'antigen nuclear Ki67 en els miocardiòcits de pacients amb cardiopatia

associada, ja fos aquesta d'origen enòlic o d'un altre tipus com ara hipertensiva, valvular, coronària o idiopàtica. En canvi, l'expressió de TERT als miocardiòcits no ha resultat útil per a detectar activitat proliferativa en aquest model biològic concret.

Diversos estudis en models animals i humans, han evidenciat la rellevància de l'expressió de TERT i la funció de les telomeres en el manteniment del potencial replicatiu cel·lular (32, 116). La longitud de les telomeres humanes s'escurça en diferents contextes com ara en les cèl·lules endotelials de plaques d'aterosclerosi, en teixit de miocardi hipertròfic, en cors en fallida cardíaca terminal i en leucòcits de pacients amb vasculopatia cerebral, hipertensió, diabetis o infart agut de miocardi (117). Altres treballs realitzats en miocardiòcits de gossos han mostrat una relació entre l'expressió de TERT, Ki67 i disfunció cardíaca (29).

En la present tesi s'hipotetitza que l'expressió de TERT podria ser útil per a avaluar el grau de proliferació miocàrdica. Tot i que l'expressió de TERT ha estat emprada com a marcador de proliferació cel·lular en diversos estudis clínics i experimentals (30-33, 118), cap d'ells s'ha realitzat sobre mostres de malalts alcohòlics amb miocardiopatia associada. La majoria de treballs que avaluen proliferació miocàrdica a través de l'expressió de TERT i Ki67 ho fan emprant miocardis afectes de cardiopatia isquèmica, hipertensió arterial i arteriosclerosi, essent els resultats sovint paradoxals. De fet està en discussió si l'escurçament de les telomeres i l'expressió de TERT són factors de risc independents o bé si són una conseqüència del dany produït sobre el miocardi (117). En existir aquestes discrepàncies, Anversa i cols (2005) suggereixen emprar més d'un marcador de proliferació miocàrdica i així poder comparar-ne els resultats (116).

En miocardiòcits humans embrionaris, mecanismes independents de TERT com l'expressió de la proteïna p16 i l'activitat de beta-galactosidasa han demostrat tenir la capacitat d'accelerar o alentir els processos d'envelliment i mort cel·lulars (119).

En teixit miocàrdic sa humà, l'expressió de TERT és molt baixa o nul·la com a conseqüència de la seva escassa capacitat de proliferació. L'índex regeneratiu en el miocardi humà no ha estat clarament establert. El que sí sembla clar és la seva variabilitat en funció de l'edat de l'individu i la presència de cardiopatia entre altres factors (120).

Bergman i cols (2009), en un interessant estudi calculen el percentatge de regeneració miocàrdica emprant C^{14} integrat en el DNA cel·lular i el situen al voltant de 0.2-2% per any en individus sans (34). Aquest percentatge disminueix clarament durant tot el procés d'envelliment de l'individu. Així, en un individu de 25 anys se situa en un 1%/any i en un altre individu de 75 anys ho fa en un 0'45%/any. Buja i Vela (2008) aproximen l'índex regeneratiu d'un individu sa en 0'0014% (14 miocits per cada milió). En individus en situació d'insuficiència cardíaca terminal l'índex és de 0'013-0.015% i en les àrees veïnes a teixit necròtic després d'un infart agut de miocardi se situa en 0'03% (6).

Avaluant de forma global els resultats d'aquests estudis es pot concloure que es corrobora l'existència d'un cert grau de resposta proliferativa del miocardi adult humà i que la intensitat d'aquesta resposta vindrà determinada per diferents factors com són l'edat de l'individu, els costums tòxics, la presència de cardiopatia, hipertensió o malaltia coronària entre d'altres (21, 22, 116).

En aquest treball esperàvem trobar un increment de la proliferació miocàrdica, ja fos reflectida en l'expressió de TERT o de Ki67, sobretot en els malalts afectes d'algun tipus de cardiopatia. Hem evidenciat un augment de l'expressió de Ki67 en aquells individus afectes de cardiopatia fos quin fos el seu origen, destacant un menor increment en aquelles d'origen enòclic en comparació amb totes les altres. Sorprenentment per nosaltres, no es va detectar expressió de TERT en cap de les 43 mostres estudiades. El fet de que l'expressió del gen control TBP es detectés en tots els casos dóna validesa al procediment tècnic realitzat. L'anàlisi de PCR en temps real és una tècnica més sensible que l'anteriorment emprada TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*) en estudis d'aquesta àrea de coneixement (33). La puresa, quantitat i idoneïtat de les mostres de RNA va ser corroborada i validada. Hi ha un estudi relacionat amb aquesta tesi realitzat per de Kok i cols (2000) que avalua l'expressió de TERT amb PCR en temps real en teixits humans. Detectà increment de l'expressió de TERT en diversos teixits tumorals, baixa expressió de TERT en teixits sans de pulmó, esófag i còlon i nul·la en pàncrees i bufeta urinària (121). El teixit miocàrdic ja té un índex de proliferació més baix que qualsevol d'aquests altres teixits esmentats prèviament, per tant es previsible que l'expressió de TERT en miocardi sa serà també nul·la.

El fet que no es detectés expressió de TERT en cap de les mostres de miocardi analitzades pot ser degut a diverses raons. Una és la possibilitat de que la regeneració sigui un mecanisme que s'esgota amb el temps si l'insult sobre el miocardi persisteix. En el cas del dany miocàrdic secundari a l'acció tòxica de l'alcohol, intervenen diversos mecanismes que regulen l'equilibri entre la inducció de l'apoptosi, la mort cel·lular i la resposta reparativa en forma de regeneració (86). Aquests mecanismes són complexos i

és probable que fins i tot siguin contraposats. Així, l'alcohol probablement disminueix la resposta regenerativa compensatòria miocàrdica. Aquesta resposta regenerativa miocàrdica també depèn del tipus de lesió que s'hi produeix. Kubo i cols (2008), en un estudi realitzat sobre miocardi humà, evidenciaren major número de *stem cells* en aquells cors més lesionats. No obstant, en situació d'isquèmia miocàrdica, inflamació o estrès oxidatiu aquesta regeneració endògena del miocardi estava clarament limitada (122).

Una de les limitacions clara de la present tesi és el relatiu poc número de mostres, degut a la dificultat que comporta obtenir mostres de miocardi humà. Probablement amb un major número de mostres haguéssim obtingut resultats més evidents i significatius. També cal remarcar que el model de malalt alcohol·lic en la present tesi és diferent del definit en altres sèries clíniques on el consum d'alcohol i la rellevància clínica de la MCP alcohol·lica dels individus era major (76, 79, 81, 82). Per altra banda, aquesta tesi analitza mostres de miocardi de pacients alcohol·lics i hipertensos, patologies que produeixen un dany difús. En canvi, la gran majoria d'estudis publicats fins el moment actual estan realitzats en miocardis afectes de cardiopatia isquèmica, on el dany es produeix de forma més intensa i focal.

En conclusió, amb els resultats obtinguts en aquest treball podem concloure que l'expressió de TERT avaluada amb PCR en temps real no és un bon marcador per estudiar la proliferació miocàrdica en aquest model biològic. No se'n va detectar expressió en cap mostra, al contrari que l'expressió de Ki67, l'altre marcador de proliferació miocàrdica emprat, essent positiva en alguns dels individus.

L'antigen nuclear Ki67 només s'expressa quan la cèl.lula està dins el cicle cel.lular, no hi ha cap cèl.lula que expressi Ki67 sense estar dins el cicle cel.lular. Pot

existir el dubte de si realment totes les cèl.lules que expressen Ki67 s'estan dividint o neoproliferant o regenerant (cariorrexí + citocinesi) o bé si simplement són cèl.lules binucleades, és a dir que han realitzat la cariorrexí però sense citocinesi. Aquesta reflexió és totalment vàlida i coherent, tenint en compte que en totes les espècies de mamífers s'han identificat cèl.lules mononucleades i també binucleades en diferent proporció (1). El cor humà, a les 3 setmanes del naixement de l'individu, presenta entre un 25 i un 57% de cèl.lules binucleades, essent aquest percentatge en rates de la mateixa edat de 85-90% (5). La utilització de la microscopia confocal juntament amb la detecció d'expressió de Ki67 resol totalment aquest dubte, ja que demostra de forma simultània la positivitats d'aquest antígen nuclear i la presència de mitosis (1,2).

En el nostre cas, no disposàvem d'aquesta darrera tècnica pel que vàrem optar per emprar com a segon marcador de regeneració l'activitat de TERT. El problema és que els resultats que hem obtingut ens han fet concloure que TERT no ha resultat un bon marcador per a avaluar la regeneració miocàrdica en el nostre treball.

En aquest treball hem observat un increment de l'expressió de Ki67 en tots els casos afectes de cardiopatia respecte els controls sans. Aquest ha estat un resultat esperat i que concorda amb la hipòtesi inicial ja que reflecteix l'existència d'una certa capacitat miocàrdica per a proliferar en resposta a una lesió persistent ja sigui de causa tòxica (alcohol), hipertensiva, isquèmica o valvular (17,22). En el cas dels individus alcohòlics amb cardiopatia associada, aquesta capacitat proliferativa és menor si es compara amb la dels individus hipertensos o amb els afectes d'altres cardiopaties. Aquesta dada reflecteix una inhibició de la capacitat proliferativa miocàrdica en exposar-se a un tòxic com és l'alcohol (83). Tots els individus afectes de cardiopatia mostren un increment d'expressió del Ki67 respecte els controls sans, però en el cas

dels individus alcohòlics amb cardiopatia aquest increment és un 67% menor que en la resta de cardiòpates d'altres orígens.

Aquests resultats es podrien explicar per les següents raons:

- 1) Per una banda, la proliferació miocàrdica pot esdevenir un mecanisme compensatori que s'esgota després d'un temps determinat de persistir la lesió.
- 2) Per altra banda, en el cas del dany miocàrdic induït per l'alcohol hi conflueixen múltiples mecanismes, més complexos que regulen el balanç entre la inducció de l'apoptosi i mort cel·lular i la resposta proliferativa reparadora (86).

Fins i tot alguns d'aquests mecanismes poden ser contraposats i d'acció paradoxal com més endavant exposarem en relació a l'acció de la miostatina.

- 3) Finalment podem constatar que hi ha evidències de que l'etanol disminueix la capacitat compensadora de la proliferació i que fins i tot pot estar inhibida.

A més a més, la capacitat proliferativa del miocardi també depèn del tipus de lesió i dels mecanismes fisiopatològics que hi intervenen. En aquest sentit, val la pena destacar els resultats de l'estudi realitzat per Kubo i cols (2008) on es posa de manifest que a major grau de cardiopatia major és el nombre de *stem cells* cardíques. No obstant, en situació d'isquèmia, inflamació o estrès oxidatiu l'èxit de la regeneració endògena miocàrdica es veu clarament limitada (122). No oblidem que l'estrès oxidatiu és un dels mecanismes implicats en la fisiopatologia del desenvolupament de la MCP alcohòlica (16) i per això pot limitar el grau de proliferació dels miocardiòcits.

En aquest estudi realitzat per tècniques d'immunohistoquímica en teixit miocàrdic s'evidencia un increment de l'expressió de miostatina en aquells individus

amb cardiopatia ja sigui d'origen enòc, hipertensiva, isquèmica, valvular o idiopàtica. Aquest ha estat un resultat esperat ja que en presència de dany miocàrdic l'expressió de miostatina està sobrerregulada (46, 123). De tots els pacients amb cardiopatia, els alcohòlics són els malalts que han presentat una major expressió de miostatina en comparació a tota la resta. Aquesta dada corrobora la hipòtesi prèvia de que l'alcohol sobrerregula la miostatina i altres factors de creixement (45).

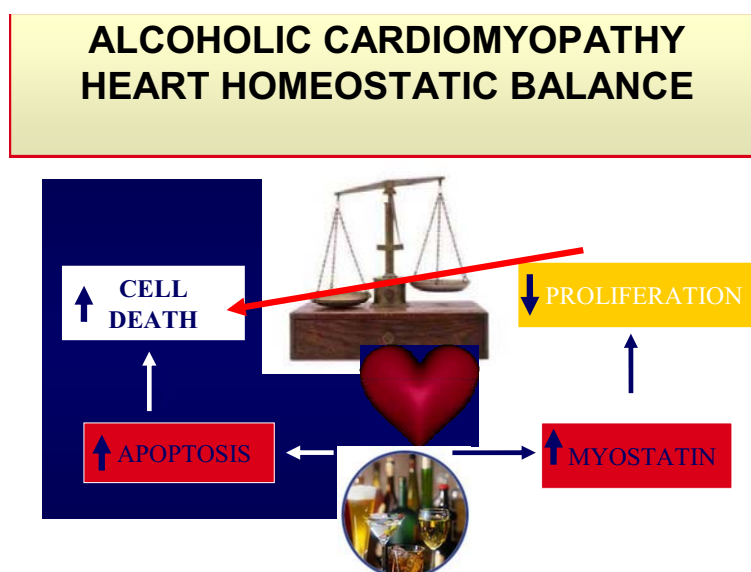
En els individus alcohòlics, el relatiu increment que s'observa en l'expressió de miostatina i el decrement en la de Ki67 està en concordança amb els resultats obtinguts en estudis experimentals previs (45). Aquests treballs suggereixen que l'alcohol té capacitat per sobrerregular la miostatina en altres teixits com ara el múscul esquelètic (45). Hi ha una clara relació clínica, funcional i estructural entre el dany produït per l'alcohol en múscul esquelètic i cardíac (78), per tant s'esperava un efecte similar pel que fa a l'expressió de miostatina en aquests dos teixits.

L'activitat de la miostatina ha mostrat tenir un efecte protector sobre els miocardiòcits respecte l'apoptosi (41). Per tant, un increment de la seva activitat podria representar un mecanisme defensiú/compensatori desenvolupat pels miocardiòcits enfront l'agressió d'un tòxic que actua persistentment com l'alcohol. Una conseqüència negativa d'aquesta sobrerregulació de la miostatina per part de l'alcohol, és un cert grau d'inhibició dels mecanismes de proliferació cel·lular, reflectit en una menor expressió de Ki67 a causa de l'efecte negatiu sobre el creixement que té la miostatina (48). Els resultats obtinguts en aquest treball evidencien que l'efecte negatiu de l'alcohol predomina sobre l'efecte protector de la miostatina en la inducció de l'apoptosi miocàrdica. Resultats obtinguts en altres estudis en aquest camp, suggereixen que la sobrerregulació de la miostatina no és l'únic mecanisme que influeix en la resposta

proliferativa miocàrdica. Altres factors com ara l'activitat de IGF-1 podrien també tenir un paper en aquests processos (45, 123). L'existència d'aquests múltiples efectes explicarien la diversitat de factors que poden induir canvis en l'homeostasi cardíaca en els individus alcohòlics.

Per tant, l'efecte que té el consum crònic d'alcohol sobre el miocardi abarca diferents aspectes: no només indueix una pèrdua cel.lular a conseqüència de l'activació de l'apoptosi, sino que també inhibeix la capacitat proliferativa dels miocardiòcits a través de la sobreexpressió de l'activitat de la miostatina o potser també d'altres factors de creixement. El resultat final és un clar desequilibri en l'homeostasi miocàrdica induïnt una pèrdua neta de la massa ventricular total amb una progressió a disfunció ventricular tal i com es reflecteix en la història natural de la MCP alcohòlica (124). Aquest efecte global condueix a una menor capacitat dels individus afectes de MCP alcohòlica per a activar mecanismes de proliferació cel.lular si els comparem amb altres individus afectes d'altres causes de cardiopatia. La següent figura il.lustra els factors que influeixen en l'homeostasi cardíaca en la MCP alcohòlica:

Figura 11. Factors que influeixen en l'homeostasi cardíaca en la miocardiopatia alcohòlica.



Pel que fa a l'activitat apoptòtica al miocardi hem obtinguts resultats similars als reportat en estudis previs (100). S'evidencia un augment de l'apoptosi en aquells individus afectes de MCPA essent mesurada per la tècnica TUNEL. A més, s'observa una activació dels mecanismes pro i anti-apoptòtics (BAX i BCL-2 respectivament) en tots els individus afectes de cardiopatia, ja sigui d'origen enòlic, hipertensiu o d'un altre origen. El grau d'apoptosi en els pacients alcohòlics fou similar al trobat en els afectes de cardiopatia hipertensiva i d'altres orígens.

Aquesta tesi avalua l'índex apoptòtic (IA) amb la tècnica TUNEL. Aquesta tècnica detecta DNA fragmentat i té les seves limitacions, amb possibilitat d'haver sobrecalculat l'IA ja que pot detectar situacions de pro-apoptosi i fragmentació reversible del DNA segons l'equilibri dels factors controladors del procés (110-113). De fet un IA molt elevat resultaria incompatible amb la viabilitat miocàrdica: si la durada de l'apoptosi és de 2 hores in vitro i 4 hores in vivo, la meitat de la massa miocàrdica desapareixeria en 40 dies (21). Aquestes dades suggereixen que l'apoptosi és un procés probablement més lent i regulat per altres factors com ara BCL2 (1).

Per a tal de minimitzar els falsos positius s'han pres les següents mesures en aquesta tesi:

- Ús de suficients camps microscòpics i identificació del tipus cel.lular en apoptosi.
- Evitar les cèl.lules de l'intertici.
- Utilització de seccions de teixits tractades amb deoxiribonucleasa (control positiu per apoptosi) i comparar l'IA entre controls sans, alcohòlics, hipertensos i altres tipus de cardiopatia.

Està clar que tot i les precaucions seguides, la tècnica pot resultar no del tot específica per l'estudi exclusiu de l'apoptosi, però aquesta mateixa imprecissió tècnica queda aplicada homogèniament a tots els grups, tant en els casos com en els controls; per tant, les diferències trobades tant intra com intergrupals són rellevants. A més, l'estudi realitzat per Fernández-Solà, Fatjó i cols el 2006 titulat *Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy* realitza un anàlisi de l'IA en cardiomiòcits humans emprant la mateixa tècnica immunohistoquímica (TUNEL) obtenint resultats similars (IA en controls sans $2.7 \pm 1.5\%$) i amb les mateixes limitacions (100).

Tot i que les diferències no foren significatives, els individus alcohòlics mostraren un valor del quocient BCL2/BAX menor que els altres grups, evidenciant així un increment relatiu dels mecanismes pro-apoptòtics. De totes formes, el grau d'apoptosi fou significativament major en aquells individus afectes de MCP alcohòlica en comparació amb els alcohòlics sense cardiopatia. Per tant, podem afirmar que sigui quin sigui l'origen de la cardiopatia, hi ha un mecanisme patogènic comú que condueix al dany miocàrdic i que conflueix en l'activació de les vies apoptòtiques (15). En els individus alcohòlics, l'apoptosi miocàrdica no depèn únicament dels efectes directes de l'alcohol sino també de la presència de dany estructural cardíac (84, 100). Per tant, és lògic plantejar que l'apoptosi miocàrdica està integrada per complexos mecanismes no només relacionats amb l'agent causal inicial (alcohol, hipertensió, etc) sino també amb altres factors intermedis que causen dany miocàrdic activant mecanismes de lesió cel.lular com ara l'activitat de les caspases mitocondrials, les alteracions en els mecanismes de transducció intracel.lular (125), en la síntesi proteica (114) o l'estrés oxidatiu (16).

Les dades obtingudes en aquesta tesi deixen entreveure la gran complexitat de tot l'entramat fisiopatològic implicat en el desenvolupament de la MCP alcohòlica, amb la convivència de múltiples mecanismes d'acció fins i tot alguns d'ells contraposats. Per això, és necessari el disseny i desenvolupament de més estudis que ens acostin a l'enteniment d'aquests complexos mecanismes que regulen la mort i la resposta proliferativa cel·lulars en els alcohòlics amb miocardiopatia associada, que aprofundeixin en l'acció de la miostatina i altres factors més novedosos intuïnt que tenen un paper en el manteniment de l'homeostasi i la plasticitat miocàrdiques en els individus alcohòlics, com ara l'activitat de IGF-1 (5). Aquells tractaments capaços d'inhibir l'activitat de la miostatina (42, 43) i/o reduir l'apoptosi miocàrdica –com el anticossos monoclonals anti-miostatina- (27, 85) o la potenciació de l'efecte de l'IGF-1 (2, 5) podrien ser útils per evitar la influència negativa d'aquest mecanisme en la resposta proliferativa miocàrdica i disminuir el dany miocàrdic progressiu que es produeix en la cardiopatia alcohòlica. També cal un millor i més profund coneixement del control del cicle cel·lular del miòcit, fet que ens podria permetre en un futur l'ús exitós de *stem cells* per a potenciar la regeneració miocàrdica (26-28).

9. CONCLUSIONS

9. CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en els estudis que conformen la present tesi doctoral, ens permeten extreure les següents conclusions:

1) Els individus afectes de miocardiopatia, independentment de la seva etiologia, presenten una major estimulació de la regeneració miocàrdica com a mecanisme compensatori enfront el dany miocàrdic. Aquest fet es reflecteix en un augment significatiu de l'expressió de l'antigen nuclear Ki67 en miocardiòcits de donants afectes de miocardiopatia de divers origen respecte als controls sans.

2) En la nostra experiència, l'expressió de TERT no ha resultat un bon marcador per a estudiar la regeneració miocàrdica, essent indetectable la seva expressió en totes les mostres estudiades en aquest treball.

3) Els individus afectes de cardiopatia, independentment del seu origen, presenten un augment significatiu de l'índex d'apoptosi mesurat per la tècnica TUNEL.

4) El grup d'alcohòlics i el d'hipertensos presenten unes activitats de pro-apoptòtica (BAX) i anti-apoptòtica (BCL-2) superiors a les del grup de controls sans. Quan hi ha cardiopatia estructural aquests valors són encara més elevats, essent els individus amb miocardiopatia alcohòlica els que presenten major activitat dels mecanismes proapoptòtics.

5) Els individus afectes de miocardiopatia alcohòlica presenten un menor increment de l'expressió de Ki67 respecte els altres afectes de cardiopatia. Aquest fet reflecteix que l'alcohol inhibeix, per una altra banda, la proliferació miocàrdica.

6) Els individus afectes de cardiopatia, independentment del seu origen, presenten un increment significatiu de l'expressió de miostatina. Els individus amb miocardiopatia alcohòlica són els que en mostren major expressió. Aquest fet, juntament amb el menor increment de l'expressió de Ki67 que presenten els individus amb miocardiopatia alcohòlica respecte els altres individus afectes de cardiopatia, posa en rellevància que l'alcohol exerceix una sobrerregulació de l'activitat de la miostatina.

De manera global, es pot concloure que l'alcohol té un efecte diferencial sobre els processos de regeneració, apoptosi i activitat de la miostatina, reflectint així que la fisiopatologia de la miocardiopatia alcohòlica és complexa, multifactorial i amb molta interrelació dels processos esmentats.

Considerem que per a millorar els coneixements en aquest camp cal seguir aprofundint sobre els mecanismes fisiopatològics de la miocardiopatia alcohòlica. Les línies d'investigació més actuals i novedoses s'orienten cap al control del cicle cel.lular del miocardiòcit i el paper del IGF-1, suggerint alguns dels resultats obtinguts que en un futur es podria plantejar el tractament de la miocardiopatia alcohòlica amb *stem cells* cardíques.

10. ANNEXES

10. ANNEXES

- Annex 1. Imprès de Model de Consentiment Informat per a la Donació d'Òrgans i Teixits
- Annex 2. Sol·licitud d'Òrgans, Teixits i Cèl·lules per recerca a UCR (Unitat de Coordinació d'òrgans i teixits per a la Recerca). Aquest és el que varem haver d'omplir tu i jo i sí que el tinc i te l'adjunto per mail.
- Annex 3. Qüestionari estructurat omplert pels familiars del pacient ("time-line follow-back method") (Sobel 1979).
- Annex 4. Consum habitual d'alcohol (Urbano-Màrquez '89 NEJM, Fdez-Solà '94 Ann Intern Med). Fòrmules de la DDA i DTA/Kg
 - La dosi diària consumida d'alcohol (DDA) s'expressa en grams d'etanol/dia. La quantitat de grams consumits varia en funció del tipus de beguda alcohòlica que es consumeix.
 - La dosi total acumulada d'alcohol consumida al llarg de la vida (DTA) es calcula multiplicant el consum diari d'etanol pel número d'anys d'alcoholisme i després per 365. S'expressa com Kg d'etanol/Kg de pes.
- Annex 5. Escala de Goldman

TABLE 4. Summary of Criteria for Specific Activity Scale Classifications

Class I:	Patient can perform to completion any activity requiring ≥ 7 metabolic equivalents
Class II:	Patient can perform to completion any activity requiring ≥ 5 metabolic equivalents but cannot or does not perform to completion activities requiring ≥ 7 metabolic equivalents
Class III:	Patient can perform to completion any activity requiring ≥ 2 metabolic equivalents but cannot or does not perform to completion any activities requiring ≥ 5 metabolic equivalents
Class IV:	Patient cannot or does not perform to completion activities requiring ≥ 2 metabolic equivalents.

Extret de l'article de Goldman L, Hashimoto B, Cook EF, Loscalzo A. Comparative reproducibility and validity of assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation* 1981; 64:1227- 34.

Annex 1. Imprès de Model de Consentiment Informat per a la Donació d'Òrgans i
Teixits:

Diligencia de voluntad de donación / Diligència de la voluntat de donació

Datos del difunto / Dades del difunt

Apellidos y nombre / Cognoms i Nom

Finalidades de la extracción / Finalitats de l'extracció

- ☐ Terapéuticas/Teràpèutiques
- ☐ Científicas (aprobadas por el Comité Ético de Investigación Clínica)/Científiques (aprovades por el Comitè Ètic de Investigació Clínica)
- ☐ Docencia/Docència

Datos del/de los declarante/s (mayor/es de edad) / Dades del/dels declarant/nts majo/rs d'edat

Apellidos y nombre/ Cognom i Nom

Relación con el difunto/Relació amb el difunt

Domicilio/Domicili

DECLARAMOS/DECLAREM:

La ausencia de conocimiento de oposición expresa del difunto para que después de su muerte se realice la extracción de sus órganos y tejidos con las finalidades citadas. En el caso que se requiera, se autoriza acceder a los datos clínicos del difunto con la certeza de mantener la estricta reserva y confidencialidad de los datos que constan.

L'absència de coneixement d'oposició expressa del difunt per a que després de la seva mort es realitzi l'extracció dels seus òrgans i teixits amb les finalitats abans esmentades. En el cas que es requereixi, s'autoriza a accedir a les dades clíniques del difunt amb la certesa de mantenir l'estricta reserva i confidencialitat de les dades que fan constar.

Firma/s del/de los declarante/s / signatura del/dels declarant/s

Fecha / Data

Annex 2. Sol·licitut d'Òrgans, Teixits i Cèl·lules per recerca a UCR (Unitat de Coordinació d'òrgans i teixits per a la Recerca):

UCR

Unitat de Coordinació d'òrgans i teixits per a la Recerca

Coordinació de Trasplantaments
Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica
Corporació Sanitària Clínic
Villarroel 170, BCN 08036
Telf: 93-2275504 Fax: 93-2275409
e-mail: mnet@clinic.ub.es

Sol.licitud d'òrgans, teixits i cèl.lules per recerca a UCR

UCR avalua les sol.licituds d'òrgans i teixits humans i les valora en funció de l'interès científic i de si és factible la seva obtenció, preservació i distribució. Una vegada aprovat, UCR estableix el protocol individualitzat per a l'obtenció, preservació i distribució del teixit en base a la informació que figura en aquesta sol.licitud. El cost derivat de les activitats de generació, extracció, control de qualitat, preservació, distribució i transport del teixit sol.licitat, serà reemborsat en la forma que es determini en cada cas.

UCR requereix previsió de la quantitat i freqüència dels teixits sol.licitats i actua en funció d'aquesta. Qualsevol canvi en el protocol ha de ser notificat amb 7 dies d'antelació. Si no ha estat notificat apropiadament a UCR, l'investigador sol.licitant serà responsable de tot teixit obtingut per a ell.

Informació referent a l'investigador, projecte de recerca i òrgans, teixits o cèl.lules sol.licitats.

1	Investigador principal	MERITXELL LLUÍS PADIERNA	
2	Títol	ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA	
3	Institució o Empresa	HOSPITAL CLÍNIC	
4	Adreça de correu	34975mll@com.es	
5	Adreça d'enviament	34975mll@comb.es	
6	Telèfon de contacte	Oficina 2242	Lab
	Dia	Oficina 2242	Lab
	Nits i festius	616502157	
	e-mail	34975mll@comb.es	
	Fax		

7	Persones de contacte autoritzades a acceptar teixit al seu laboratori	
	Nom	Telèfons contacte (Lab, oficina, personal, busca)
	JOAQUIM FERNÁNDEZ SOLÀ	TEL. 2588 BUSCA 13-822
	Si les condicions d'extracció ho requereixen, almenys una persona ha d'estar disponible 24h al dia i 7 dies a la setmana per acceptar el teixit.	

8	Co-investigadors que utilitzaran el teixit	
	Nom	Telèfons de contacte (Lab, oficina, personal)
	JOSEP ORIOLA	LABORATORI GENÈTICA

9	Títol del projecte de recerca	ESTUDI DE LA REGENERACIÓ MIOCÀRDICA EN LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA I LA SEVA RELACIÓ AMB EL DANY FUNCIONAL IM ESTRUCTURAL MIOCÀRDIC, ACTIVACIÓ D'APOPTOSI I ACTIVITAT MIOSTATINA
----------	-------------------------------	---

10	Fonts finançament	PREMI FINAL DE RESIDÈNCIA
	Codi del projecte	

11	Resum del projecte de recerca (2-3 pag)	
	a. Abstract (1/2 pag)	
	b. Objectius	
	c. Resultats esperats	
	d. Resultats preliminars	
	e. Mètodes	
	f. Conclusió resultats preliminars	
	g. Referències	

12	Adjuntar còpia de la carta d'aprovació del projecte de recerca, pel Comitè de Recerca, Director d'I+D o l'autoritat apropiada de la institució o empresa sol.licitant.
-----------	--

13	Adjuntar còpia del Curriculum Vitae de l'investigador principal
-----------	---

14 Teixits, quantitat i freqüència

Tipus de teixit*	Mida**	Classe de Donant***			Nombre de mostres****		
		DMC	DAC	Indiferent	S	M	A
MIOCARDI	2 G ÀPEX	X					x

*Aquells teixits utilitzats pels bancs de teixits o òrgans amb finalitat terapèutica només estaran disponibles per finalitats científiques quan el donant no compleixi algun dels criteris d'inclusió (p.ex: edat, neoplàsic, patologia coneguda etc..) o per excés en el propi banc.

**La mida o quantitat del teixit haurà de ser donada en termes de totalitat de l'òrgan, pes en grams, dimensions en cm, o volum en cm³.

***Donant en mort cerebral (DMC): El cos és mantingut amb ventilació artificial. Els òrgans i teixits disponibles serien els no aptes per a ser trasplantats. Normalment els òrgans són perfosos amb UW.

Donant exitus mort per aturada cardiorrespiratòria (DAC). El cos és mantingut refrigerat. El temps mínim d'obtenció de teixits és de 6-8 hores.

**** S=setmanal, M=mensual, A=anual

15 Edat del donant 30-80 ANYS

16	Preservació	
	Fresc	DEMEM RPMI PBS UW
	+ antibiòtics?	SI NO X
	Altres medis proporcionats per l'investigador	
	Fixat	Formaldehid 10%
		Altres
	Cogelat a -80°C	
	Congelat en Nitrogen líquid X	
	Altres Les mostres s'han de prendre ABANS d'iniciar la perfussió amb UW	

17 Temps màxims d'extracció, preservació i lliurament

Donant en aturada cardíaca

Mort-preservació	6	8	10	12	18	24
Preservació-lliurament	24	36	48			
Donant en mort cerebral						
Clampatge-preservació	0	1	2	3		
Preservació-lliurament	<6X	12	24	>24		
Altres consideracions						

18	Contraindicacions	
	Quimioteràpia	
	Radiació	
	Sepsis	
	Ventilador	
	Medicació	
	Substàncies d'abús	
	Enfermetats	
	Infeccions	HIV+
	Altres	

19	Condicions enviament	
	x Cada mostra una vegada obtinguda	
	Fer enviaments de	mostres
	Altres	
20	Retornar la sol.licitud complimentada per e-mail, i una còpia signada per fax. La documentació complementària pot ser enviada per e-mail, correu o fax. Aquella documentació signada haurà de ser enviada per correu o fax.	

SIGNATURA

Nom de l'Investigador: MERITXELL LLUÍS PADIERNA
Data:29/06/05

Data d'acceptació

Annex 3. Qüestionari estructurat omplert pels familiars del pacient ("time-line follow-back method") (Sobel 1979):

EVALUATION OF ALCOHOL CONSUMPTION IN ORGAN DONORS

ALCOHOL UNIT.

Alcohol consumption will be evaluated in all cases of organ donors either in heart or liver transplanted.

Questionnaire of alcohol consumption habits will be performed by an expertise member of the Alcohol Unit, by interview with almost two different familiar members of the donor subject.

Type, average quantity per year and frequency of ethanol intake will be recorded, as well as and proportion of alcohol beverages. Recent (daily alcohol consumption in the last month) and lifetime alcohol consumption will be evaluated,

Live events such as marriage, military service and work will be used as “anchor points” for recollection to prompt recall (time-line follow-back method) according to *Sobell LC, Maisto SA, Sobel MB, Cooper AM.*

Reliability of alcohol alcohol reports on drinking behaviours. Behav Res Ther 1979; 17: 157-160).

This method has been used at our Alcohol Unit for longtime, and, in our experience is the most reliable in this situation.

- Daily alcohol intake (DDA) will be quantified in grams / day.
- Total lifetime dose of alcohol (TLDE) (Kg of ethanol per Kg of body weight) will be estimated by multiplying the daily consumption of ethanol by the number of years of each alcohol intake period times 365 and adding the amounts of each period.

Patients with longstanding chronic diseases such as chronic liver disease, neoplasia, chronic infections (B or C hepatitis or HIV virus) or heart failure will be excluded from the study.

NON-ALCOHOLIC CONTROLS: In this group, subjects should have a mean ethanol intake lower than 20 g per week.

EPIDEMIOLOGICAL VARIABLES:

Name:

Clinical Record Number:.....

Age:.....

Sex:.....

Height:.....

Weigh:.....

Body Mass index:.....

ALCOHOL CONSUMPTION VARIABLES:

- Starting consumption:.....
- Total period of alcohol consumption:.....
- Daily dose of alcohol (mean consumption of last month):.....
- Total Lifetime dose of alcohol (Kg EToH/ Kg body weight):...
- Percentage final of Wine.....% . Beer.....% .Spirits.....%

PERIODS OF ALCOHOL CONSUMPTION:**FIRST PERIOD:**

Anchor Point: ...

Type of consumption:

Daily ☐ Weekend ☐ Other ☐

Starting at (age):

Ending at (age)

Duration (years):

Daily dose of Wine d/day:

Daily dose of Beer g/day:

Daily dose of Spirits g/day:

Number of drinks of Wine a day:

Number of drinks of Beer a day:

Number of drinks of Spirits a day:

Comments.....

SECOND PERIOD:

Anchor Point: ...

Type of consumption:

Daily ☐ Weekend ☐ Other ☐

Starting at (age):

Ending at (age)

Duration (years):

Daily dose of Wine d/day:

Daily dose of Beer g/day:

Daily dose of Spirits g/day:

Number of drinks of Wine a day:

Number of drinks of Beer a day:

Number of drinks of Spirits a day:

Comments.....

THIRD PERIOD:

Anchor Point: ...

Type of consumption:

Daily ☐ Weekend ☐ Other ☐

Starting at (age):

Ending at (age)

Duration (years):

Daily dose of Wine d/day:

Daily dose of Beer g/day:

Daily dose of Spirits g/day:

Number of drinks of Wine a day:

Number of drinks of Beer a day:

Number of drinks of Spirits a day:

Comments.....

FOURTH PERIOD:

Anchor Point: ...

Type of consumption:

Daily ☐ Weekend ☐ Other ☐

Starting at (age):

Ending at (age)

Duration (years):

Daily dose of Wine d/day:

Daily dose of Beer g/day:

Daily dose of Spirits g/day:

Number of drinks of Wine a day:

Number of drinks of Beer a day:

Number of drinks of Spirits a day:

Comments.....

FIFTH PERIOD:

Anchor Point: ...

Type of consumption:

Daily ☐ Weekend ☐ Other ☐

Starting at (age):

Ending at (age)

Duration (years):

Daily dose of Wine d/day:

Daily dose of Beer g/day:

Daily dose of Spirits g/day:

Number of drinks of Wine a day:

Number of drinks of Beer a day:

Number of drinks of Spirits a day:

Comments.....

11. BIBLIOGRAFIA

11. BIBLIOGRAFIA

1. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003;92:139-50.
2. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998;83:1-14.
3. Astorri E, Chizzola A, Visioli O, Anversa P, Olivetti G, Vitali-Mazza L. Right ventricular hypertrophy: a cytometric study on 55 human hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1971;2:99-110.
4. Lomanto LD, Ortiz OL, Bretón CO, Gómez AI, Mesa VM. El ciclo celular. *MEDUNAB* 2003;6(16):21-29.
5. Ahuja P, Sdek P, MacLellan R. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease and regeneration. *Physiol Rev* 2007;87:521-544.
6. Buja LM, Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovascular Pathology* 2008;17:349-374.
7. Hill J, Olson E. Mechanisms of disease: Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 2008;358:1370-80.
8. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997;25:82-88.
9. Joris MI. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
10. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

11. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high- conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:33-50.
12. Thornberry NA. The caspases family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997;53:146-147.
13. Potts MB, Vaughn AE, McDonough H, Patterson C, Deshmukh M. Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J Cell Biol* 2005;171:925-930.
14. Kajstura J, Leri A, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am* 2004;84(1):161-77.
15. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest* 2003;111(10):1457-9.
16. Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badia E, Sacanella E, Estruch R, Nicolás JM. Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(5):864-870.
17. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002 Jan 10;415(6868):240-3.
18. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002;8(6):S518-25.
19. Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail* 2002;8(6):S264-8.
20. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001(7);344(23):1750-7.

21. Anversa, Sussman MA, Bolli R. Molecular genetic advances in cardiovascular medicine. *Circulation* 2004;109:2832-8.
22. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003 (19);114(6):763-76.
23. Anversa P, Nadal-Ginard B. Cardiac chimerism: methods matter. *Circulation* 2002(29);106(18):129-131.
24. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 1998(13);83(1):15-26.
25. Quaini F, Urbanek K, Graiani G, Lagrasta C, Maestri R, Monica M, Boni A, Ferraro F, Delsignore R, Tasca G, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P. The regenerative potential of the human heart. *Int J Cardiol* 2004 ;95(1):S26-8.
26. Taylor DA, Hruban R, Rodriguez ER, Goldschmidt-Clermont PJ. Cardiac chimerism as a mechanism for self-repair: does it happen and if so to what degree?. *Circulation* 2002(2);106(1):2-4.
27. von Harsdorf R, Poole-Wilson PA, Dietz R. Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure. *Lancet* 2004(17);363:1306-13.
28. Regula KM, Rzesutek MJ, Baetz D, Seneviratne C, Kirshenbaum LA. Therapeutic opportunities for cell cycle re-entry and cardiac regeneration. *Cardiovasc Res* 2004(1);64(3):395-401.

29. Leri A, Quaini F, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death and myocyte regeneration in the failing human heart. *Ital Heart J.* 2001;3:12S-14S.
30. Leri A, Kajstura J, Li B, Sonnenblick EH, Beltrami CA, Anversa P, Frishman WH. Cardiomyocyte aging is gender-dependent: the local IGF-1-IGF-1R system. *Heart Dis* 2000;2(2):108-15.
31. Leri A, Franco S, Zacheo A, Barlucchi L, Chimenti S, Limana F, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Blasco MA. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J* 2003(2);22(1):131-9.
32. Djojotubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 2003 Apr 30;15(2):164-75.
33. Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 (28);98(18):10308-13. Epub 2001 Aug 21.
34. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009(3);324(5923):98-102.
35. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002;8(6):S518-25.
36. Magdelénat H. Tumour markers in oncology: past, present and future. *J Immunol Methods* 1992(24);150(1-2):133-43.

37. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998(21);95(15):8801-5.
38. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):611-22.
39. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003(2);100(18):10440-5. Epub 2003 Aug 19.
40. Arce VM, Carneiro I, Fernández-Nocelo S, Devesa J. La miostatina: un regulador autocrino/paracrino del desarrollo muscular. *Endocrinol Nutr* 2005;52(7):350-7.
41. Joulia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res* 2006; 312(13):2401-2414.
42. Wagner K, Liu X, Chang X, Allen R. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *PNAS* 2005;102(7):2519-24.
43. Yang W, Zhang Y, M Ga, Zhao X, Chen Y, Zhu D. Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;326(3):660-66.
44. McNally E. Powerful genes-myostatin regulation of human muscle mass. *N Engl J Med* 2004;350(26):2642-44.

45. 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(6):E916-26.
46. Sharma M, Kambadur R, Mathews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*. 1999;180:1-9.
47. Atraza JN, Reisz-Porszasz S, Dow JS, Kloner RA, Tsao J, Bhasin S and Gonzales-Cadavid NF. Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. *Journal of Endocrinology* 2007;194: 63–76.
48. McKoy G, Bicknell KA, Patel K & Brooks G. Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on fetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular Research* 2007;74: 304–312.
49. Cohn RD, Liang HY, Shetty R, Abraham T and Wanger KR. Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. *Neuromuscular Disorders* 2007;17: 290–296.
50. Wang B, Chang H, Kuan P and Shyu K. Angiotensin II activates myostatin expression in cultured rat neonatal cardiomyocytes via p38 MAP kinase and myocyte enhance factor 2 pathway. *Journal of Endocrinology* 2008;197: 85–93.
51. Rosenqvist M. Alcohol and cardiac arrhythmias. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:318S-322S.
52. Koskinen P, Kupari M. Alcohol and cardiac arrhythmias. *BMJ* 1992;304:1394-1395.

53. Moushmoush B, Abi-Mansour P. Alcohol and the heart. The long-term effects of alcohol in the cardiovascular system. *Arch Intern Med* 1991;151:36-42.
54. Frost L, Vestergaard P. Alcohol consumption and the risk of atrial fibrillation or flutter-secondary publication. A cohort study. *Ugeskr Laeger* 2005;167:3308-3310.
55. Frost L, Vestergaard P. Alcohol consumption and the risk of atrial fibrillation or flutter: a cohort study. *Arch Intern Med* 2004;164:1993-1998.
56. Steinbigler P, Haberl R, konig B, Steinbeck G. P-wave signal averaging identifies patients prone to alcohol-induced paroxysmal atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2003;91:491-494.
57. Kupari M, Koskinen P. Time of onset of supraventricular tachyarrhythmia in relation to alcohol consumption. *Am J Cardiol* 1991;67:718-722
58. Koskinen P, Kupari M. Alcohol consumption of patients with supraventricular tachyarrhythmias other than atrial fibrillation. *Alcohol Alcohol* 1991;26:199-206.
59. Klatsky AL, Friedman GD, Siegelaub AB, Gerard MJ. Alcohol consumption and blood pressure Kaiser-Permanent Multiphasic Health Examination data. *N Engl J Med* 1977;296:1194-1200.
60. Miller PM, Anton RF; Egan BM, Basile J, Nguyen SA. Excessive alcohol consumption and hypertension: clinical implications of current research. *J Clin Hypertens* 2005;7:346-351.
61. Estruch R, Sacanella E, De la Sierra A, Aguilera MT, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Coca A, Urbano-Marquez A. Effects of alcohol withdrawal on 24

hour ambulatory blood pressure among alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:2002-2008.

62. Puddey IB, Jenner DA, Beilin LJ, Vandongen R. Alcohol consumption, age and personality characteristics as important determinants of within-subjects variability in blood pressure. *J Hypertens* 1989;6:S617-S619.

63. Randin D, Vollenweider P, Tappy L, Jequier E, Nicod P, Scherrer U. Suppression of alcohol-induced hypertension by dexamethasone. *N Engl J Med* 1995;332:1733-1737.

64. Stewart SH. Alcohol and inflammation: a possible mechanism for protection against ischemic heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002;12:148-151.

65. Gronbaek M, Deis A, Sorensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. *BMJ* 1995;310:1165-1169.

66. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Marquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2004;175:117-123.

67. Savouret JF, Berdeaux A, Casper RF. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: a fundamental trigger for cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003;13:104-113.

68. de Lorgeril M, Salen P, Guiraud A, Boucher F, de Leiris J. Resveratrol and non-ethanolic components of wine in experimental cardiology. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003;13:100-103.

69. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, Camm AJ, Northfield TC. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997;78:273-277.
70. Rodríguez ME, Camí J. Alcoholism among inpatients in a general hospital in Barcelona, Spain. *Int J Addict* 1988;23:29-46.
71. Askanas A, Udoshi M, Sadjadi SA. The heart in chronic alcoholism: a noninvasive study. *Am Heart J* 1980;99:9-16.
72. Silverbauer K, Juhasz M, Ohrenberger G et al. Noninvasive assessment of left ventricular diastolic function by pulsed Doppler echocardiography in young alcoholics. *Cardiology* 1988;75:431-439.
73. Kupari M, Koskinen P, Suokas A et al. Left ventricular filling impairment in asymptomatic chronic alcoholics. *Am J Cardiol* 1990;66:1473-1477.
74. Lazarevic AM, Nakatani S, Neskovic AN. Early changes in left ventricular function in chronic asymptomatic alcoholics: relation to the duration of heavy drinking. *Jam Coll Cardiol* 2000;35:1599-1606
75. Mathews EC, Gradin JM, Henry WL. Echocardiographic abnormalities in chronic alcoholics with and without overt congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1981;47:570-578.
76. Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 1989;320:409-415.
77. Piano MR. Alcoholic cardiomyopathy. *Chest* 2002;121:1638-1650.

78. Fernández-Solà J, Estruch R, Grau JM, Pare JC, Rubin E, Urbano-Márquez A. The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med.* 1994 Apr 1;120(7):529-36.
79. Nicolás JM, Fernández-Solà J, Estruch R, Paré JC, Sacanella E, Urbano-Márquez A, Rubin E. The effect of controlled drinking in alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med.* 2002;136(3):192-200.
80. Urbano-Márquez A, Estruch R, Fernández-Solà J, Nicolás JM, Paré JC, Rubin E. The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and myopathy in women compared with men. *JAMA* 1995;274(2):149-154.
81. Fernández-Solà J, Estruch R, Nicolas JM, Paré JC, Sacanella E, Urbano-Márquez A. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am J Cardiol.*1997;80(4):481-485.
82. Fernández-Solà J, Nicolas JM, Oriola J, Sacaanella E, Estruch R, Rubin E, Urbano-Márquez A. Angiotensin-converting enzyme gen polymorphism is associated with vulnerability to alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med.* 2002;137(5 part 1):321-326.
83. Urbano-Márquez A, Fernández-Solà J. The effect of alcohol on cardiac and skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2004;30(6):689-707.
84. Jänkälä A, Eriksson P, Eklund K, Härkönen M, Mäki T. Combined calcium carbimide and ethanol treatment induces high blood acetaldehyde levels, myocardial apoptosis and alters expression of apoptosis-regulating genes in rat. *Alcohol & Alcoholism.* 2002;37(3):222-228.

85. Webster K, Bishopric N. Apoptosis inhibitors for heart disease. *Circulation*. 2003;108:2954.
86. Molina P, McClain P, Valla D, Guidot D, Diehl A, Lang C, Neuman M. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(1):120-128.
87. Preedy VR, Peters TJ. The acute and chronic effects of ethanol on cardiac muscle proteins synthesis in the rat in vivo. *Alcohol* 1990;7:97-102.
88. Preedy VR, Patel VB, Why HJF. Alcohol and the heart: biochemical alterations. *Cardiovasc Res* 1996;31:139-147.
89. Swinghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215-262.
90. Meehan J, Piano MR, Solaro RJ. Heavy long-term ethanol consumption induces an β - to α -myosin heavy chain isoforms transition in rat. *Basic Res Cardiol* 1999;94:481-488.
91. Figueredo VM, Change KC, Baker AJ. Chronic alcohol induced changes in cardiac contractility are not due to changes in the cytosolic Ca^{2+} transient. *Am J Physiol* 1998;275:H122-H130.
92. Piano MR, Schwertz DW, Solaro RJ. Effect of pimobendan and isoproterenol in the alcoholic myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:237-242.
93. Guppy LJ, Littleton JM. Binding characteristics of the calcium channel antagonist [3H]nitrendipine in tissues from ethanol dependent rats. *Alcohol Alcoholism* 1994;29:283-293.

94. Guppy LJ, Littleton JM. Effect of calcium, Bay K 8644 and reduced perfusion on basic indices of myocardial function in isolated hearts from rats after prolonged exposure to ethanol. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:480-487.
95. Danziger RS, Sakai M, Capogrossi MC. Ethanol acutely and reversibly suppresses excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 1991;68:1660-1668.
96. Guarnieri T, Lakatta EG. Mechanism of myocardial contractile depression by clinical concentrations of ethanol. *J Clin Invest* 1990;85:1462-1467.
97. Schulman SP, Lakatta EG, Weiss RG. Contractile, metabolic and electrophysiologic effects of ethanol in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:417-426.
98. Alexander CS. Electron microscopic observations in alcoholic heart muscle disease. *Br Heart J* 1967;29:200-206.
99. Tsiplenkova VG, Vikhert AM, Cherpachenko NM. Ultrastructural and histochemical observations in human and experimental alcoholic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:27A-32A.
100. Fernández-Solà J, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, Urbano-Márquez A, Nicolás JM. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Hum Pathol* 2006;37(8):1100-10.
101. Urbano-Márquez A, Fernández-Solà J. Musculo-skeletal problems in alcohol abuse. In: Peters TJ, Edwards G editors. *Evaluation of the health and social consequences of alcohol abuse*. Harvard Press 1996:123-144.

102. Adams MA, Hirsts M. Ethanol-induced cardiac hypertrophy: correlation between development and the excretion of adrenal catecholamines. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:33-38.
103. Adams MA, Hirsts M. Lack of cardiac-1-adrenergic involvement in ethanol-induced cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;7:240-245.
104. Adams MA, Hirsts M. Metoprolol suppresses the development of ethanol-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:562-567.
105. Molkenstein JD, Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Ann Rev Physiol* 2001;63:391-426.
106. Fauchier L, Babuty D, Poret P et al. Comparison of long-term outcome of alcoholic and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur heart J* 2000;21:306-314.
107. Guía Española de Hipertensión Arterial 2005. Disponible en <http://www.seh-lelha.org/>.
108. Lip G, Felmeden D, Li-Saw-Hee F and Beevers D. Hypertensive heart disease. A complex syndrome or a hypertensive 'cardiomyopathy'?. *European Heart Journal* 2000;21:1653-1665.
109. Beaumont J, Arias T, López B, González A, Ravassa S, Hermida N, Querejeta R y Díez J. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2007;7:14F-21F.
110. Hughes SE. detection of apoptosis using in situ markers for DNA strand breaks in the failing human heart: fact or epiphenomenon. *J Pathol* 2003;201:181-6.
111. Koda, Takemura G, Kanoh M, Hayakawa K, Kawase Y, Maruyama R, Li Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Myocytes positive for in situ markers for DNA

breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither failed nor dilated: a manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure. *J Pathol* 2003; 199:229-36.

112. Kanoh, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ Nick end-labelling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999;99:2757-64.

113. Sarastre. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 1999;24:189-95.

114. Fernandez-Solà J, Preedy VR, Lang CH, Gonzalez-Reimers E, Arno M, Lin JC, Wiseman H, Zhou S, Emery PW, Nakahara T, Hashimoto K, Hirano M, Santolaria-Fernández F, González-Hernández T, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Nicolás JM, Urbano-Márquez A. Molecular and cellular events in alcohol-induced muscle disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31(12):1953-62.

115. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009;361(16):1570-1583.

116. Anversa P, Rota M, Urbanek K, Hosoda T, Sonnenblick EH, Leri A, Kajstura J, Bolli R. Myocardial aging--a stem cell problem. *Basic Res Cardiol* 2005;100(6):482-93.

117. Fuster JJ, Andrés V. Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006;99:1167-1180.

118. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005(14);102(24):8692-7.

119. Ball AJ, Levine F. Telomere-independent cellular senescence in human fetal cardiomyocytes. *Aging Cell* 2005;4(1):21-30.
120. Hosoda T, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Mechanisms of myocardial regeneration. *Circ J* 2010;74(1): 13-17.
121. de Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, van Bokhoven A, Willems HL, Swinkels DW. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin Chem* 200;46(3):313- 318.
122. Kubo H, Jaleel N, Kumarapeli A, Berretta R, Bratinov G, Shan X, Wang H, Houser SR, Margulies KB. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human heart. *Circulation* 2008;118: 649-657.
123. Shyu KG, Lu MJ, Wang BW, Sun HY, Chang H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *European J Clin Invest* 2006;36: 713–719.
124. Fernández-Solà J, Sacanella E, Estruch R, Lluís M, Antúnez E, Urbano-Márquez A. Factors influencing myocyte death and regeneration in alcoholic cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;38(6):308A.
125. Nicolás JM, Antúnez E, Thomas AP, Fernández-Solà J, Tobías E, Estruch R, Urbano-Márquez A. Ethanol acutely decreases calcium transients in cultured human myotubes. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22(5):1086-92.