
**MECANISMES FISIOPATOLÒGICS DE LA
MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA:
CANALS DE CALCI, APOPTOSI I
ESTRÈS OXIDATIU.**

TESI DOCTORAL

FRANCESC FATJÓ I HURIOS

A la Yolanda pel seu amor,
als meus pares i germans per construir-me.

El Doctor JOSE M NICOLÁS ARFELIS, professor associat de la Facultat de Medicina de la UB, Metge Consultor de l'Àrea de Vigilància Intensiva de l'Hospital Clínic de Barcelona

i

El Doctor JOAQUIM FERNÁNDEZ-SOLÀ, professor associat de la Facultat de Medicina de la UB, Metge Consultor del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFIQUEM que la memòria titulada **“MECANISMES FISIOPATOLÒGICS DE LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA: CANALS DE CALCI, APOPTOSI I ESTRÈS OXIDATIU”** presentada per Francesc Fatjó i Hurios, ha estat realitzada sota la nostra direcció i considerem que reuneix les condicions necessàries per a ser defensada davant del Tribunal corresponent per a optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

Dr. Josep Maria Nicolás Arfelis.

Dr. Joaquim Fernández-Solà.

ÍNDEX	Pàgines.
1. AGRAÏMENTS.....	9
2. ABREVIATURES.....	11
3. INTRODUCCIÓ I REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.....	13
3.1. Conceptes generals sobre el miocardi.....	13
3.1.1. L'estructura del miòcit.....	13
3.1.2. Les proteïnes contràctils.....	14
3.1.3. El fenomen de contracció-relaxació en el cor.....	14
3.2. L'alcohol i el sistema cardiovascular.....	15
3.2.1. Epidemiologia sobre el consum patològic d'alcohol.....	15
3.2.2. Efectes de l'alcohol en el sistema cardiovascular.....	16
3.2.2. A. Arítmies cardíques.....	16
3.2.2. B. Hipertensió arterial.....	17
3.2.2. C. Malaltia coronària.....	18
3.3. L'alcohol i la miocardiopatia alcohòlica.....	19
3.3.1. Introducció.....	19
3.3.2. Cardiopatia alcohòlica i consum d'alcohol.....	20
3.3.3. Canvis estructurals i funcionals del miocardi.....	21
3.3.4. Clínica i tractament de la MCPA.....	21
3.3.5. Les dones i la MCPA.....	22
3.3.6. Mecanismes fisiopatològics de la MCPA.....	22
3.4. Els canals de calci i la miocardiopatia alcohòlica.....	27
3.4.1. Introducció al metabolisme i als receptors de calci.....	27
3.4.2. El fenomen d'acoblament excitació – contracció.....	29

3.4.3. Els canals de calci tipus-L i els receptors de rianodina.....	31
3.4.4. Els canals de calci i l'alcohol.....	32
3.5. El fenomen de l'apoptosi i la miocardiopatia alcohòlica.....	33
3.5.1. Introducció al fenomen de la mort cel·lular.....	33
3.5.2. Mecanismes bàsics de l'apoptosi.....	35
3.5.3. Apoptosi i sistema cardiovascular.....	38
3.5.3.A Apoptosi i insuficiència cardíaca.....	38
3.5.3.B Apoptosi i cardiopatia isquèmica.....	39
3.5.4. Apoptosi i miocardiopatia alcohòlica.	39
3.6. L'estrès oxidatiu i la miocardiopatia alcohòlica.....	40
3.6.1. Introducció al fenomen de l'estrès oxidatiu.....	40
3.6.2. L'estrès oxidatiu i el sistema cardiovascular.....	41
3.6.3. L'estrès oxidatiu i l'alcohol.....	43
4. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS.....	45
5. OBJECTIUS.....	47
6. TREBALLS PUBLICATS.....	49
6.1. Up-regulation of myocardial L-type Ca ²⁺ channels in chronic alcoholism.....	51
6.2. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy.....	83
6.3. Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism.....	97
7. DISCUSSIÓ.....	109
8. CONCLUSIONS.....	117
9. BIBLIOGRAFIA.....	121

1. AGRAÏMENTS

Aquesta Tesi Doctoral hauria estat impossible de realitzar sense molta gent que de forma directa ha participat, o bé en la seva elaboració, o bé donant-me un suport imprescindible. Malgrat el risc de caure en oblits no puc menys que destacar-ne els següents per la seva significació:

A en Josep Maria Nicolás i a en Joaquim Fernández-Solà, sense la dedicació, generositat, paciència i direcció desinteressada dels quals aquesta tesi doctoral hagués estat del tot impossible de realitzar.

A la Yolanda, per no deixar-me caure i acollir-me quan ho necessito, per ser estímul i per ser recer.

Als meus pares, la Rosa i en Josep, als meus germans, en Josep i en Jordi, als meus avis Mercè i Manel i a la resta de la família, perquè m'ajuden a créixer i m'acompanyen en el meu camí.

A en Josep Maria Grau pel seu suport des del silenci i per assenyalar el camí per arribar a ser internista.

A en Santi Nogué, amb el que vaig fer les primeres passes en el món de la publicació i en el que més tard vaig descobrir una persona profundament humana i un amic.

Al grup de recerca d'alcohol del Servei de Medicina Interna: professor Alvaro Urbano-Márquez, Dr. Emilio Sacanella, Dr. Ramón Estruch, Dra. Glòria Garcia, Dra. Meritxell Lluís pel seu suport.

A en Gabriel, la Maria, la Marta i la Glòria, amb els que vaig començar el camí de l'especialitat i amb els que vaig compartir experiències inoblidables.

A la Meritxell, en Joan Carles, la Georgina, en Pep, en Toni i en Gabriel (altre cop), el millor que m'ha regalat l'Hospital Clínic i que aconseguiré conservar.

A l'Esther, en Pau Sancho, en Ramon Bataller, l'Eva i tota la colla del laboratori, que tan pacientment em van iniciar en els misteris inescrutables de la recerca i em van ajudar a resoldre els enigmes d'aquell món màgic anomenat "Laboratori".

Als primers amb els que vaig començar a caminar a l'Hospital Clínic: la Montse Laguno, l'Ernest Bragulat i "l'incombustible" Albert Bové.

Als meus companys del servei d'urgències de l'Hospital Clínic, especialment la Blanca, l'Óscar, en Miquel, en Jota, la Sònia, la Carme, la Mar i tants com em deixo, germans de trinxera, amb els que vaig aprendre el que no surt als llibres.

Als meus residents petits (vosaltres sabeu qui sou, qui sóc) i als estudiants amb els que vaig tenir la sort de coincidir, perquè em van estimular a fer-ho millor (a ser millor).

Al Quim Martínez Montauti, al grup de Medicina Interna i, especialment, als meus companys d'Urgències de l'Hospital de Barcelona que m'han facilitat el temps i m'han animat a acabar el projecte (ja no us torturaré més amb aquest tema).

2. ABREVIATURES

AEC: acoblament excitació – contracció.
AMPc: adenosín momofosfat cíclic.
ANG-II: angiotensina-II
Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1
ARA-II: antagonistes del receptor ANG-II.
ATP: adenosin trifosfat.
Ba: bari.
Ca: calci
[Ca]_i: concentració intracitosòlica de calci.
CC-L: canals de calci L.
ECA: enzim convertidor angiotensina.
GP: glutation peroxidasa.
GR: glutation reductasa.
HDL: high density lipoprotein.
IECA: inhibidors de la ECA.
K: potassi.
LDH: lactat deshidrogenasa.
MCP: miocardiopatia.
MCPA: miocardiopatia alcohòlica.
Node AV: node auriculo-ventricular.
Node SA: node sino-auricular.
NYHA: New York Heart Association.
ON: òxid nítric.
OMS: Organització Mundial de la Salut
PAI-1: inhibidor-1 de l'activador del plasminogen.
PCR: proteïna C reactiva.
RNAm: acid ribonucleic missatger.
ROS: reactive oxygen species.
RSP: reticle sarcoplasmàtic
RyR: receptors de raiodina.
SNC: sistema nerviós central.
SOD: superòxid dismutasa.
TNF: factor de necrosi tumoral.
VE: ventricle esquerra.
XIAP: X-lligat inhibidor de l'apoptosi proteïna.

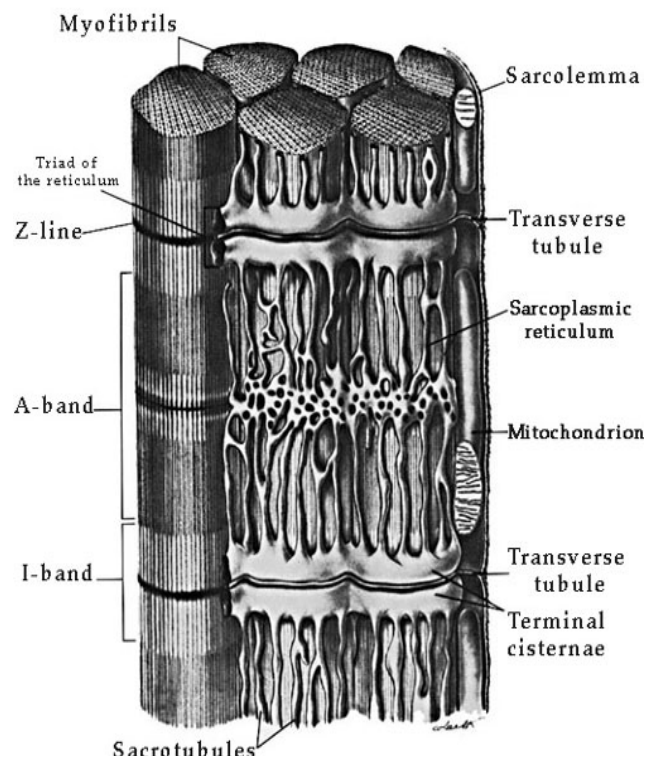
3. INTRODUCCIÓ I REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.

3.1 CONCEPTES GENERALS SOBRE EL MIOCARDI.

3.1.1. L'estructura del miòcit.

Més de la meitat del miòcits estan constituïts per les proteïnes contràctils, estructurades de manera que donen lloc a les característiques bandes fosques i clares en microscopia electrònica. Les bandes més fosques, les bandes A, corresponen als filaments més gruixuts i contenen principalment miosina però també altres com nebulette, titin i miosin-binding proteïna C. A cada costat d'una banda A es troben les zones clares, les bandes I, que contenen els filament fins, principalment actina, tropomiosina i el complex troponina. Les bandes I estan travessades per una línia fosca i fina que és la línia Z que delimita la sarcòmera.

Per tant, cada sarcòmera, que quedarà entre dues línies Z, contindrà en la part central una banda A flanquejada per dues bandes I. L'escurçament de la sarcòmera en el moment de la contracció succeeix quan els filaments fins s'aproximen cap el centre de les bandes A mitjançant la formació de ponts entre la miosina i l'actina que són ATP dependents (2-4).



3.1.2. Les proteïnes contràctils.

Hi ha sis tipus de proteïnes en els miofilaments que són les responsables del procés de contracció muscular i del seu control. Aquestes són: la miosina, l'actina, la tropomiosina i els tres components del complex troponina, és a dir, troponina I, C i T. La miosina és una molècula dimèrica que conté una estructura allargada que podríem anomenar "cua" i una zona més globular que anomenarem "cap". Aquesta zona globular és la que conté les zones lligant amb l'actina i la ATPasa. La velocitat amb la que la miosina hidrolitza l'ATP determinarà tant la velocitat d'escurçament del múscul com la intensitat de la seva contracció (5). L'actina és una proteïna de pes molecular inferior respecte a la miosina, que forma una macromolècula en hèlix de doble filament, i que es troba al centre del filament prim. Interacciona directament amb la miosina i activa la seva ATPasa. La tropomiosina és una molècula allargada formada per una hèlix de dues cadenes peptídiques que es situa entre les dues cadenes de l'actina i regula la relació miosina-actina. El complex troponina té tres components: la troponina T, que uneix el complex a la tropomiosina, i la troponina I que, juntament amb la tropomiosina, regula la relació miosina-actina. Per últim, la troponina C, és la que conté zones d'alta afinitat per al calci i la que lligarà a aquest quan és alliberat en el citosol en la darrera fase del complex excitació-contracció (6).

3.1.3. El fenomen de contracció-relaxació en el cor.

Les alteracions en les fases de relaxació i contracció cardíaca són troballes pràcticament constants en els pacient amb miocardiopatia. Aquestes anomalies s'atribueixen a diferents canvis en els processos cel·lulars que

inclouen alteracions en les vies metabòliques per l'obtenció d'ATP, en les bombes i els canals iònics, en els processos de relaxació i contracció, i en les proteïnes que participen en el procés d'acoblament contracció-excitació.

La contracció cardíaca és un fenomen energia dependent que s'activa quan el calci entra en el citosol a través dels canals de calci. La contracció es "desactiva", i el miocardi entra en fase de relaxació, quan el calci es transportat activament fora del citosol. Ambdós processos requereixen energia.

Poden dividir els fluxs de calci responsables de la contracció i la relaxació en dos cicles: en el cicle extracel·lular el calci es mou entre l'espai extracel·lular i el citosol. En el cicle intracel·lular els fluxs de calci s'estableixen entre el reticle sarcoplasmàtic, el citosol i les proteïnes dels miofilaments que són sensibles als canvis de concentració del calci. L'entrada extracel·lular de calci al citosol es fa a través dels canals de calci tipus-L i actua com un disparador o gallet, que activa els canals alliberadors de calci que es troben en el reticle sarcoplasmàtic. El transport del calci fora del citosol que donarà lloc a la relaxació muscular, és un procés actiu que suposa hidròlisi de ATP i en el que participen bombes i intercanviadors de ions (1).

3.2 L'ALCOHOL I EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.

3.2.1. Epidemiologia sobre el consum patològic d'alcohol.

Es considera consum excessiu d'alcohol la ingesta superior a 80gm/dia en homes i de 60 gm/dia en dones. A Europea, en el Pla d'Acció de la OMS contra el Alcohol, es va valorar que al voltant del 40%-60% de les morts, incloses les lesions intencionades i no intencionades, eren atribuïbles al

consum d'alcohol. Així mateix es va considerar que l'alcohol era el responsable del 9% de les malalties a la Comunitat Europea, suposant un cost d'entre el 2% i el 5% del producte nacional brut (7).

Quan descendim a nivell estatal el Ministeri de Sanitat i Consum assenyalava que fins a un 10% de la població presenta un consum excessiu d'alcohol i que l'edat d'inici es situa al voltant dels 13 anys. El primer grup de població afectada es situaria entre els 45-65 anys i el segon entre 16-24 anys, amb un predomini dels homes (18%) sobre les dones (2%). A Catalunya es valora que el 7% de la població presentava un consum excessiu d'alcohol (8).

Les patologies més associades al consum d'alcohol són: hepatopaties, neuropaties, cardiopaties i malalties immunològiques/infeccioses. (9)

3.2.2. Efectes de l'alcohol en el sistema cardiovascular.

A més de la miocardiopatia alcohòlica, motiu de la tesi, hi ha descrits en la literatura altres efectes de l'alcohol en el sistema cardiovascular, entre els que caldria destacar els següents:

3.2.2. A. Arítmies cardíques.

La relació de les arítmies amb el consum d'alcohol ha estat àmpliament documentat en la literatura (10-12). L'exposició aguda a la ingesta alcohòlica pot generar arítmies, principalment de tipus supraventricular, com el flutter, sent la fibril·lació auricular la que ha estat objecte de més estudis (13-17). Degut als costums socials actuals, que suposen una ingesta superior d'alcohol durant el cap de setmana, va aparèixer en la literatura mèdica el terme *Holiday Heart syndrom* (síndrome del cor durant el cap de setmana) per la descripció de

taquiarítmies supraventriculars en pacients que realitzaven una ingesta d'alcohol superior a l'habitual durant les seves vacances (18,19). Malgrat la benignitat de la majoria dels casos també s'han descrit arítmies malignes associades, sobre tot, al consum crònic d'alcohol en malalts afectes de cardiopatia alcohòlica. Alguns d'aquests estudis apunten a una major incidència de mort sobtada i d'arítmies ventriculars en els mateixos. Els mecanismes principals proposats en aquests casos són les alteracions de la repolarització amb QT allargat així com alteracions en el control vagal de la freqüència cardíaca (20,21).

3.2.2. B. Hipertensió arterial.

La relació entre el consum d'alcohol i la presència d'hipertensió arterial ja va ser assenyalada per primera vegada a la Primera Guerra Mundial per Lian C (22). El següent estudi rellevant, que va incloure 87000 pacients va ser realitzat per Klatsky i cols. el 1977 (23). Des de llavors s'han realitzat múltiples estudis que coincideixen en assenyalar els següents aspectes: el consum excessiu d'alcohol (molts estudis el defineixen com consum superior a 3 begudes/dia) està clarament associat a hipertensió arterial tan sistòlica com diastòlica, independentment del sexe, l'edat, del grup ètnic o del tipus de beguda consumida. També s'ha pogut comprovar que una reducció en el consum està associat a una reducció dosi-depenent de la tensió arterial tant sistòlica com diastòlica (23-25). El mecanisme ha estat motiu de molta controvèrsia. S'ha apuntat a una alteració del control del sistema simpàtic, tant dels baroreceptors (26) com per una activació en el SNC (27). Molts estudis han aprofundit en la participació de les catecolamines i del eix renina-angiotensina-aldosterona, sent

els resultats altament contradictoris i no concloents (28-32). També hi ha algunes publicacions que suggereixen una alteració del metabolisme del sodi (33-34) i altres ions com el magnesi (35).

3.2.2. C. Malaltia coronària.

Hi ha molts estudis que han demostrat la disminució dels accidents cardiovasculars quan es compara el grup de consumidors moderats d'alcohol amb el grups d'abstinents (36-39). L'efecte protector de l'alcohol sobre la malaltia coronària es va interpretar inicialment per la seva acció sobre els lípids, amb un augment de les HDL (40) així com pel seu efecte sobre les plaquetes com a antiagregant. (41,42). Segons alguns treballs això es tradueix en un millor pronòstic i una millor recuperació després d'un infart agut de miocardi i, fins i tot, en una disminució de la incidència de mort sobtada associada a accident isquèmic agut (43-45). El progressiu aprofundiment en la comprensió de la malaltia arterioscleròtica ha arribat a entendre a aquesta com una malaltia inflamatòria crònica de la paret vascular(46) i alguns autors han estudiat la relació dels nivells de interleucina-6, TNF, PCR i PAI-1 amb consum d'alcohol (47). Recents estudis han demostrat que els pacient amb consum moderat d'alcohol presenten una menor resposta inflamatòria que podria ser atribuïda a l'alcohol o a algun dels components de les begudes alcohòliques (48). En aquesta direcció hi ha estudis molt interessants centrats en el vi negre. Gronback i cols. assenyalen que en un estudi fet amb diferents begudes alcohòliques només el vi negre va demostrar una disminució de la mortalitat per esdeveniments cardiovasculars (49,50). Una possible explicació d'aquest fenomen podria raure en una substància que es troba en diferents vegetals i en

molt alta concentració en el vi negre, el revesratrol, que és un antagonista natural del receptor aril-hidrocarbó. Aquest receptor té diferents lligants que l'activen, donant lloc a un augment en l'expressió de citokines pro-inflamatòries. D'aquesta manera, la capacitat de protecció vascular del vi negre seria en darrer terme causada per una disminució en la producció de citocines (51-53).

3..3. L'ALCOHOL I LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA.

3.3.1. Introducció.

La miocardiopatia alcohòlica (MCPA) és una malaltia específica del múscul cardíac de causa tòxica i que està classificada dins dels grup de les cardiomiopaties dilatades (54), tot i que en ocasions es fa referència a aquesta entitat com a malaltia del múscul cardíac en relació a l'alcohol (55).

La primera referència documentada de la relació entre el consum d'alcohol i l'afectació cardíaca la va fer Bollinger el 1884 en el que es va anomenar *Munich beer heart* perquè l'estudi es va realitzar a Munich i en autòpsies practicades en consumidors de cervesa, en els que va detectar dilatació cardíaca i signes d'hipertròfia (56).

La MCPA, al igual que altres cardiopaties com podria ser la idiopàtica, està caracteritzada per una dilatació del ventricle esquerre, una reducció del gruix de la seva paret i un increment de la massa total del ventricle. Degut a que no hi ha troballes immunològiques o immunohistoquímiques específiques el diagnòstic sempre és per exclusió d'altres causes en presència de consum excessiu d'alcohol.

La MCPA representa el 3.8% de tots els casos de miocardiopatia, sent la segona causa de cardiopatia dilatada al món occidental (54). Alguns treballs de cardiopatia dilatada han reportat que entre el 23%-40% dels pacients dels estudis presentaven un consum excessiu d'alcohol (57).

3.3.2. Cardiopatia alcohòlica i consum d'alcohol.

Hi ha certa discussió respecte l'existència d'una relació lineal entre la duració i la dosi acumulada d'alcohol consumit i l'aparició d'alteracions estructurals i funcionals en el miocardi; hi ha publicacions que no han trobat una correlació entre aquestes dues dades (58-61) tot i que el nostre grup ha publicat la relació directa entre dosi total d'alcohol consumida al llarg de la vida (kg ethanol/kg pes) amb l'increment de massa del ventricle esquerre i la depressió de la fracció d'ejecció (62). En general, els pacients que presenten alteracions cardíques funcionals i estructurals refereixen un consum superior a 100 grams/dia durant més de 5 anys, tot i que la majoria d'estudis reporten una duració en el consum superior a 15 anys (58-61). Sembla que una clau determinant en el desenvolupament de la MCPA seria el temps d'exposició a l'alcohol; en aquest sentit Mathews i cols. determinen en un estudi que la diferència entre el grup d'alcoholics amb MCPA i els asimptomàtics no rau en la dosi diària d'alcohol sinó en el temps de consum (10 anys versus 6 anys, respectivament) (63). Urbano-Márquez i cols. apunten en la mateixa direcció, amb una diferència entre els grups de 24.8 anys versus 16.2 anys. En general es considera que la mínima dosi que es requereix per a desenvolupar una MCPA seria de 7 kg d'etanol per kg de pes corporal en homes i 5 kg d'etanol per kg de pes corporal en dones (62).

3.3.3. Canvis estructurals, funcionals i histològics del miocardi en la MCPA.

El consum crònic d'alcohol produeix una disfunció del ventricle esquerre dosi-depenent amb afectació tant sistòlica com diastòlica que es tradueix en una disminució de la fracció d'ejecció i una alteració en la relaxació respectivament (62). El primer canvi que es detecta en el cor és la dilatació del VE i l'increment de la seva massa. Posteriorment apareix la disfunció diastòlica i finalment la sistòlica (58, 59, 62). Alguns pacients també mostren un aprímadament de la paret del VE que sempre acompanya a una dilatació del mateix i que s'ha interpretat com un canvi compensatori. Histològicament destaca la presència de miocitolisi, hipertròfia del miòcit i fibrosi intersticial. La miocitolisi s'evidencia en forma de vacuolització cel·lular i desestructuració de les miofibrilles que finalment comporta una pèrdua de les mateixes (62). Hi ha una relació inversament proporcional entre la fracció de volum de miòcits i el consum d'alcohol de manera que aquells que tenen un consum d'alcohol més elevat presentat un grau més important de fibrosi miocàrdica.

3.3.4. Clínica i tractament de la MCPA.

Els símptomes i signes de la MCPA no es diferencien dels propis de la miocardiopatia d'altres causes i no hi ha un tractament específic farmacològic per aquesta entitat. El que caldria destacar és que, mentre que la mortalitat és la mateixa entre el grup d'alcohòlics abstinentes i el grup de pacients amb cardiopatia dilatada idiopàtica, els pacients que no aturen el consum excessiu d'alcohol presenten una mortalitat superior. En aquest sentit alguns estudis han demostrat que, quan degut al tractament farmacològic tots tres grups (control, alcohòlic i cardiopatia idiopàtica) milloren hemodinàmicament, per exemple en

un dels paràmetres principals com és com la fracció d'ejecció, quan no hi ha una aturada en el consum d'alcohol el grup de no abstinentes presenten una mortalitat superior (57,63).

3.3.5. Les dones i la MCPA.

Hi ha molt pocs estudis que hagin centrat l'estudi de la MCPA en dones i cap d'ells que contemplin el paper dels estrògens. Urbano-Marquez et col demostra en un estudi que les dones presenten miopatia i cardiomiopatia a dosis inferiors d'alcohol que els homes (64). Un altre dels estudis de referència és el de Fernández-Solà et col. on es va constatar que el grup de dones presentaven una dosi tòxica d'alcohol acumulada menor, un temps menor de consum i globalment una classe funcional (NYHA) millor. Malgrat això requerien una dosi acumulada total d'alcohol consumit menor per a desenvolupar el mateix grau de disfunció sistòlica que el grup d'homes (65).

3.3.6. Mecanismes fisiopatològics de la miocardiopatia alcohòlica.

Els possibles mecanismes fisiopatològics de la MCPA es coneixen parcialment gràcies a models animals. El problema d'aquests rau en la dificultat per a desenvolupar models de consum crònic, ja que el temps necessari és massa perllongat i la dosi tòxica acumulada requerida no és tolerable a curt termini, en termes de supervivència, pels animals d'estudi.

Els treballs estan centrats, per una banda, en els efectes de l'alcohol sobre el miocardi, tant a nivell histològic com cel·lular: miòcits, disfunció d'organel·les intracel·lulars, alteració de proteïnes contràctils, alteracions en l'homeostasi del calci, canvis en la cadena oxidativa i alteracions metabòliques.

Per l'altra hi ha estudis centrats en l'alteració dels mecanismes relacionats amb el sistema cardiovascular: el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el sistema autònom simpàtic (norepinefrina), les citoquines i el factor natriurètic atrial. En farem una breu descripció:

- I) *Alteració dels miòcits.* Hi ha alguns estudis que han aprofundit en l'apoptosi, la mort cel·lular programada, com un dels principals mecanismes causants de la MCPA (66). Chen i cols., en un estudi amb línia cel·lular de miòcits, evidencia la presència d'un augment de l'apoptosi a la infusió aguda d'alcohol; observa un augment de la proteïna pro-apoptòtica Bax així com una augment de l'activitat de la caspasa-3 (67). En canvi altres estudis amb metodologia pràcticament idèntica no han aconseguit reproduir aquestes troballes (68). Malauradament aquests estudis tenen limitacions importants: per una banda estan fets sobre línia cel·lular i no pas sobre teixit. A més són models animals i, a part de que són models d'exposició aguda, les dosis d'alcohol usades serien mortals per l'ésser humà (500mg/dL). La present tesi assaja l'estudi d'aquest mecanisme en relació a la MCPA obviant aquests problemes al treballar sobre mostres de miocardi humà de pacients amb consum excessiu crònic d'alcohol.

- II) *Disfunció d'organel·les intracel·lulars.* Les dues estructures en les que s'han centrat els principals estudis són els mitocondris i el reticle sarcoplasmàtic. En mitocondris s'ha trobat alteracions de la

cadena respiratòria així com dels fluxs de calci (69,70) i també un augment de la presència d'ésters d'àcids grassos que podrien ser causants d'alterar la funció mitocondrial (71). També s'ha demostrat la presència d'alteració dels fluxs de calci en el reticle sarcoplasmàtic que en estudis de microscopia electrònica es correspon amb una desorganització d'aquesta organel·la (72,73).

III) *Les proteïnes contràctils.* Es postula que l'alcohol podria generar una disminució en la síntesis de les proteïnes contràctils (74), encara que hi ha estudis que no han trobat canvis en la síntesis de l'actina, la vimentina, la tropomiosina i les cadenes lleugeres de miosina I i II (75). També s'han observat canvis de les isoformes de la cadena pesada de la miosina (tant de la quantitat de proteïna com del RNAm), concretament de disminució de la forma β -miosina a favor de α -miosina. Aquest canvi, que s'acompanya d'una disminució de l'activitat de l'ATP, s'ha interpretat com un mecanisme d'eficiència en l'ús energètic ja que inicialment redueix la freqüència de contracció i el consum d'ATP (76,77).

IV) *El metabolisme del calci.* El metabolisme del calci i els seus fluxs dins del miòcit són claus en els processos de contracció-relaxació muscular. La regulació del calci és molt complexa i depèn de diferents factors com són els receptors tipus-L, les bombes de transport, (com la de Na/Ca), i el funcionament del reticle

sarcoplasmàtic (RSP). Un dels aspectes més estudiats ha estat els fluxs de calci en el citosol i la seva implicació en la MCPA. Figueredo i cols. no van trobar diferències en aquests fluxs entre el grup control i el grup alcohòlic ni tampoc en la quantificació de proteïnes, com la bomba ATP dependent, suggerint que la clau podria trobar-se en la sensibilitat dels miofilaments (78-79). Altres estudis han focalitzat l'atenció en la participació dels canals de calci tipus-L; Guppy i cols. han demostrat una sobre-expressió dels canals de calci tipus-L en rates exposades de forma aguda a alcohol (80,81). Hi ha treballs que han demostrat que l'efecte inotrópic negatiu de l'alcohol roman malgrat l'augment progressiu de concentracions de calci a l'espai extracel·lular o la presència d'antagonistes dels canals de calci, tornat a incidir en que la clau estaria en la sensibilitat dels miofilaments (79, 82-84). En la present tesi s'aprofundirà en la participació dels canals de calci tipus-L en la patogènesi de la MCPA.

- V) *Cadena oxidativa*. El miocardi, com tots els teixits, té un sistema metabòlic que permet neutralitzar els radicals lliures (85,86). Alguns estudis han demostrat alteracions en el sistema antioxidant del miocardi en pacient amb cardiopatia dilatada o fallada cardíaca (87,88). Hi ha treballs que han determinat alteracions en el múscul esquelètic d'alcohòlics (89) mentre que altres autors han postulat el rol dels agents oxidants en el desenvolupament de cardiopatia en alcohòlics (90,91). També hi

ha alguna publicació que ha proposat que el dany miocàrdic podria generar sobre-expressió de factors antioxidants independentment de la causa de la lesió (92). En la present tesi intentarem aprofundir en el paper de l'estat oxidatiu en la gènesi de la MCPA.

- VI) *Alteracions metabòliques.* Una de les alteracions més amplament documentada rau en l'alteració del metabolisme del glucogen consistent en un augment de la concentració de glucogen muscular per la inhibició parcial de la glucogen fosforilasa quimasa així com una disminució de l'activitat de la piruvat quimasa (93-94). No hi ha, però, clara relació entre aquesta alteració i el desenvolupament de MCPA (95).
- VII) *Sistema neurohormonal.* Hi ha alguns treballs que han demostrat una augment en l'eliminació urinària de norepinefrina i epinefrina i han relacionat aquests nivells amb les mesures morfomètriques cardíques, suggerint que aquestes catecolamines juguen un paper destacat en la gènesi de la hipertròfia induïda per l'alcohol (96-98). En aquesta línia alguns autors han demostrat un augment en l'activació dels receptors α 1-adrenèrgics que estimula l'hipertròfia dels miòcits (99).

3.4. ELS CANALS DE CALCI I LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA.

3.4.1. Introducció al metabolisme del calci i als receptors de calci.

En les cèl·lules excitables la concentració de Ca intracel·lular $[Ca]_i$ és 10000 cops menor que la concentració extracel·lular ($0.1\mu\text{M}$ vs 1mM). Per altra banda l'interior de la cèl·lula és electronegatiu (-85 a -55mV). Això dóna lloc a un gradient electroquímic que facilita l'entrada de Ca a la cèl·lula. Durant l'activació cel·lular la $[Ca]_i$ augmenta fins a 100 cops (fins $10\mu\text{M}$) com a conseqüència de l'entrada de Ca extracel·lular a través de la membrana i/o l'alliberació de Ca dels seus dipòsits intracel·lulars. L'entrada de Ca a través del sarcolema tenen lloc a través de canals específics o per l'intercanvi Na-Ca.

A la membrana cel·lular hi ha diferents canals de calci:

1. Canals de calci voltatge-depenent.
 - a. Baix llindar d'activació: canals T.
 - b. Alt llindar d'activació: canals L, T, N, P, Q, R.
2. Canals activats per receptors.
3. Canals activats per segons missatgers (proteïnes G, inositol trifosfat, AMPc).
4. Canals activats per l'alliberació intracel·lular de Ca.
5. Canals activats per factors físics (estirament/pressió).

Al miocardi i a les fibres muscular llises vasculars només hi ha dos menes de canals: els L i els T, tots dos canals voltatge-depenents. La seva localització, característiques i funcions són les següents:

	Canals de calci-L	Canals de calci-T
Funció	<ul style="list-style-type: none"> ∅ Acoplament excitació-contracció. ∅ Fase-2 potencial d'acció. ∅ Excitació-contracció a través del node A-V. ∅ Secreció neurotransmisors i factors de creixement. 	<ul style="list-style-type: none"> ∅ Activitat marcapàs del node sino-auricular (SA). ∅ Expressió gènica. ∅ Modulació d'enzims i canals iònics (k).
Distribució	∅ General	∅ Node SA i fibres de Purkinje.
Caract.:		
- N° canals:	3-5 (μM^2)	0.1-0.3 (μM^2)
- Densitat:	1.7-8.5 (pA/pF)	0.5-2.9 (pA/pF)
- Selectivitat	Ca > Ba	Ca = Ba
- Llindar	- 30 mV	\leq 60 mV
- Conductància	16-24 pS	6-8 pS
- I _{max}	0 a +20 mV	-40 mV
- Inactivació	voltatge/[Ca] _i	voltatge

I_{max}: corrent màxima.

La cinètica d'activació-inactivació és diferent en tots dos canals:

- Activació: els canals T s'activen quan la membrana es despolaritza fins a -70mV i la corrent màxima arriba a -40mV. En canvi els canals L s'activen a -30mV i la corrent arriba al seu màxim entre 0 a +20 mV.

- Inactivació: els canals T s'inactiven molt ràpidament, pel que es produeixen obertures transitòries (T=transient), mentre que en els canals L la inactivació és molt més lenta (L= long) donant lloc a obertures més perllongades. A més, els canals T són únicament voltatge-dependents, mentre que en els canals L també depenen de la $[Ca]_i$.

A partir d'aquestes diferències funcionals tan rellevants es poden entendre els diferents rols que desenvolupen aquests receptors en el miocardi; així, mentre que els canals T regulen la freqüència de les cèl·lules marcapàs cardíques (node sino-auricular), els canals L participen en el fenomen d'acoblament excitació - contracció (AEC) (100).

3.4.2. El fenomen d'acoblament excitació – contracció.

S'anomena acoblament excitació – contracció (AEC) al procés mitjançant el qual es coordina la despolarització del sarcolema excitat i l'augment transitori de $[Ca]_i$ amb la pròpia contracció de les fibres musculars concretades per la interacció actina-miosina Ca-dependents (101).

Com esmentaven anteriorment la concentració de Ca intracel·lular $[Ca]_i$ és 10000 cops menor que la concentració extracel·lular (0.1 μ M vs 1mM). Això dona lloc a un gradient electroquímic que facilita l'entrada de Ca a la cèl·lula. Durant l'activació cel·lular la $[Ca]_i$ augmenta fins a 100 cops (fins 10 μ M) com a conseqüència de l'entrada de Ca extracel·lular a través de la membrana i/o l'alliberació de Ca dels seus dipòsits intracel·lulars. Per a saturar els llocs d'unió

de la troponina C, la funció de la qual és necessària per a la regulació de la contracció, és suficient una concentració de $10\mu\text{M}$. Per tant el miocardiòcit ha de regular de forma molt precisa els canvis de $[\text{Ca}]_i$ durant el fenomen de AEC, ja que aquest serà el responsable del senyal elèctric del potencial de membrana que esdevindrà fenomen mecànic de contracció muscular.

El procés de AEC comença amb el potencial d'acció que despolaritza el sarcolema. Hi ha les següents fases:

- Fase 0 del potencial d'acció: ràpida i breu corrent interna de Na^+ , amb entrada d'aquest en el citoplasma a través de canals ràpids de Na^+ voltatge-depenents.
- Fase 1: període de repolarització ràpida. Hi ha un lent i perllongat moviment de Ca cap l'interior del citoplasma a través dels canals lent de calci voltatge-depenents. (canals de calci-L).
- Fase 2: és la fase d'altiplà on l'entrada de Ca s'equilibra amb la sortida de K^+ .
- Fase 3: d'hiperpolarització, en la que la sortida continua de K^+ cap a l'espai extracel·lular mitjançant canals específics repolaritza la membrana.

Tot i que el mecanisme de contracció depèn de la corrent de Ca des de l'espai extracel·lular a l'espai intracel·lular la quantitat que penetra és insuficient, per si sola, per a activar els miofilaments (102); aquest flux, però, és fonamental perquè desencadena la sortida de calci dels seus compartiments intracel·lulars (reticle sarcoplasmàtic, mitocòndria, nucli) assolint-se

concentracions de calci molt elevades. Posteriorment el calci serà recuperat pel reticle sarcoplasmàtic mitjançant una ATPasa i lligat a la calciquestrina, mentre que la bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ desplaçarà al calci del citosol a l'espai extracel·lular.

3.4.3. Els canals de calci tipus-L i els receptors de rianodina .

La contracció muscular està regulada per l'elevació de la $[\text{Ca}]_i$ mitjançant la intervenció de dues proteïnes de membrana: els canals de calci tipus-L (CC-L), que són voltatge depenents, i els receptors de rianodina (RyR). Els CC-L estan localitzats en els túbuls-T, unes invaginacions de la membrana citoplasmàtica, i estan separats físicament dels RyR, que es troben en el reticle sarcoplasmàtic.

Hi ha diferències estructurals significatives entre els CC-L en el múscul esquelètic respecte al miocardi. En el múscul esquelètic els CC-L s'organitzen en tètades, amb associació de 4 polipèptids en unió no covalent. El porus està format per la subunitat α_1 1.1 amb tres subunitats auxiliars $\alpha_2\delta_1$, β_{1a} , i γ_1 , formant una proteïna de membrana heteroligomèrica de 430 kDa de massa (103). En canvi, en el miocardi, els CC-L estan formats per tres isoformes de α_1 que són la α_1 1.2, la β (majoritàriament les isoformes β_2 i β_3), i la $\alpha_2\delta_1$. La significació de l'absència del polipèptid γ_1 és motiu de controvèrsia i alguns estudis amb ratolins sense polipèptid γ_1 han demostrat que, tot i estar en relació a la modulació de l'amplitud del potencial d'acció i de la cinètica d'inactivació dels canals, no és imprescindible pel fenomen de AEC (104).

La interacció entre els CC-L i els RyR apareix quan després de la despolarització del miòcit els CC-L s'activen i deixen entrar calci a l'interior del

citòsol. Això estimula al RyR que alliberaran el calci del RSP a l'interior del citòsol (105).

La unitat α_1 dels CC-L és la responsable dels fluxs de calci a través del sarcolema i conté la zona lligant pels antagonistes dels canals de calci, com és la dihidropiridina, les fenilalquilamines i les benzodiazepines; és per aquesta raó que els CC-L també són coneguts com a receptors de dihidropiridina.

3.4.4. Els canals de calci i l'alcohol.

La primera demostració de que l'alcohol alterava els fluxs de calci va ser realitzada per Thomas i cols. al demostrar l'existència d'una disminució dels fluxs en el $[Ca]_i$ en suspensions de miocardiòcits aïllats exposats a etanol en períodes breus. L'amplitud del flux va disminuir de forma reversible amb etanol (40-200nM), amb una disminució del pic de $[Ca]_i$ (106) .

Hi ha estudis d'exposició crònica a etanol que s'han centrat en els CC-L; un estudi amb model animal va demostrar una sobre-expressió dels CC-L en rates exposades a etanol (107). Altres estudis han apuntat la possibilitat de que l'alcohol disminueixi la capacitat del RSP per actuar com a dipòsit de calci (108).

La majoria de publicacions sobre l'efecte crònic d'alcohol s'han trobat amb la dificultat de que els models animals són inadequats per a models d'exposició crònica a alcohol, sigui perquè haurien de ser períodes molt perllongats d'exposició, sigui perquè la dosi total d'alcohol/kg pes del subjecte d'estudi que es vol assolir seria massa tòxica pels animals d'experimentació. En la present tesi focalitzarem l'atenció en els CC-L en mostres de miocardi humà i en un model d'exposició crònica a l'alcohol.

3.5. EL FENOMEN DE L'APOPTOSI EN LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA.

3.5.1. Introducció al fenomen de mort cel·lular.

Actualment es considera que el procés de mort cel·lular es presenta en tres fases (109):

- Fase pre-letal: canvis potencialment reversibles que duen a la cèl·lula a dues vies possibles: l'oncosis i l'apoptosi.
- Fase letal: en el que la cèl·lula entra en un punt de no retorn; hi ha augment del calci intracitosòlic així com augment inespecífic de la permeabilitat de la membrana cel·lular.
- Fase de necrosi: fase final que comporta lisi cel·lular.

Oncosis. És un terme que van propugnar Joris (110) per a fer referència als canvis que porten a la destrucció cel·lular després d'una lesió irreversible, en el que l'edema cel·lular és l'element més destacable. Aquest depèn de l'alteració del metabolisme energètic (ATP) i de les alteracions iòniques (inhibició de la ATPasa Na^+/K^+ , augment de Ca^{+2} , Na^+ , Cl^- i pèrdua de K^+). Hi ha una activació de proteases que generen una desestructuració del citoesquelet amb formació de vacúols.

Apoptosi. És el nom que Kerr va donar als canvis morfològics que succeeixen en les cèl·lules i les duen a la seva mort per un mecanisme diferent de la oncosis (111). Es caracteritza per canvis inicials en el nucli i posteriorment en el citoplasma en les següents fases:

- 1) Inici de la condensació i marginalització de la cromatina amb acúmul·ls focals de masses de cromatina en la perifèria del nucli.
- 2) Desintegració dels nucleols i encongiment del nucli.
- 3) Fragmentació nuclear.
- 4) Retracció/disminució del volum citoplasmàtic.
- 5) Recol·locació i compactació d'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 amb creació de cossos apoptòtics.
- 9) Despreniment dels cossos apoptòtics.
- 10) Fagocitosi dels cossos apoptòtics per macròfags i cèl·lules veïnes.
- 11) Absència de reacció inflamatòria quan la cèl·lula es destruïda.

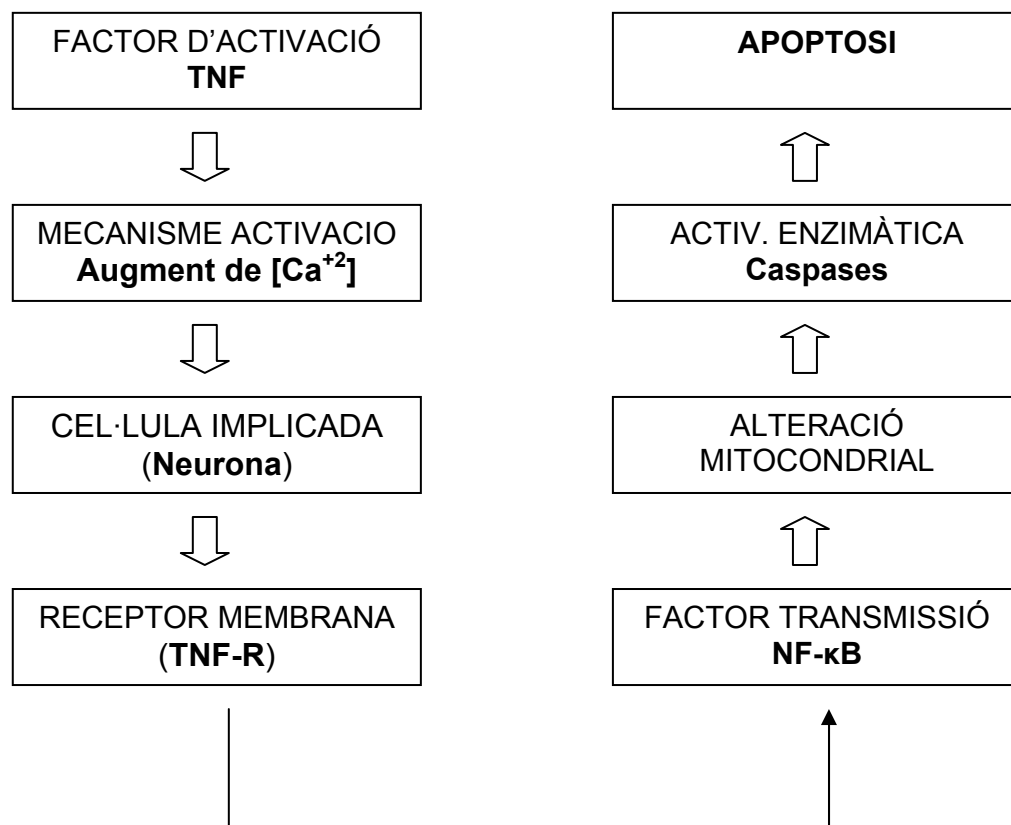
La fase clau del procés de l'apoptosi és la ruptura internucleosòmica de la cromatina del DNA degut a l'activació d'endonucleases (caspases i DNAases).

Necrosi. És el fenomen que es produeix després de la mort cel·lular, sigui per apoptosi o per oncosis. En ambdós casos els patrons convergeixen en l'edema mitocondrial, cariòlisi i disrupció de la continuïtat citoplasmàtica.

Morfològicament la necrosi es caracteritza per fenòmens com la hipereosinofilia, la picnosi nuclear, la cariorrexis i la cariòlisi focal. El procés clau és el dany en la membrana cel·lular; hi ha una alteració moderada dels sistemes de transport que duu a un augment de la permeabilitat de la mateixa i finalment a una disrupció deguda a activació de les fofolipases calci-dependents.

3.5.2. Mecanismes bàsics de l'apoptosi.

Es consideren varies fases seqüencials dins del fenomen de l'apoptosi i diferents vies que hi duen. En el següent esquema mostrem, com exemple, una de les vies clàssiques amb les seves fases:



- A) Fase d'iniciació i vies d'execució: multitud d'estímuls diferents poden ser els responsables de l'activació de l'apoptosi i, de fet, qualsevol inductor d'oncosis cel·lular pot induir l'apoptosi si la cèl·lula sobreviu a l'insult agut. Les dues vies principals que usen els iniciadors d'apoptosi són les següents:

- ∉ Via Fas → 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 (ON). Té un gran paper en la regulació immunològica de manera que la seva inhibició en troba en diferents malalties limfoproliferatives i autoimmunes.
- ∉ Via TNF → és el prototip d'una ampla família de citocines que interaccionen amb una superfamília de receptors, els TNF-R. La seva acció apoptòtica sovint ve mediada per un factor nuclear, el NF-kB, que també pot activar-se per altres senyals com radicals superòxid o la proteïnasa C.

B) Fase efectora: els dos factors principals són l'alteració de la permeabilitat mitocondrial i l'activació de les caspases.

- ∉ Alteració mitocondrial → l'alteració mitocondrial que portarà a l'edema de la mateixa rau en un porus de transició de permeabilitat en la membrana interna de la mitocòndria. Es tracta d'un canal de calci que presenta dues conformacions possibles però que adopta de forma irreversible (degut a la saturació dels receptors per calci) una conformació d'alta conductivitat. Això acabarà activant factors proapoptòtics i induint edema osmogènic del mitocondri (112).

∄ Les caspases → són un tipus específic de proteases que actuen fonamentalment a nivell mitocondrial i que intervenen en l'apoptosi a través de la inhibició de l'alliberació del citocrom C o per acció de la gramicidina (113). Les caspases s'activen entre elles en un mecanisme de cascada i activen altres proteïnes inductores d'apoptosi (DNAases).

C) Mecanismes de regulació: els tres mecanismes principals que participen en la regulació del fenomen de l'apoptosi són el BCL-2, el BAX i XIAP.

∄ BCL-2 → és tracta d'una proteïna que es troba en cèl·lules hematopoiètiques, limfoides, epitelials, musculars i neuronals i que té una acció clarament anti-apoptòtica. Es localitza preferentment en la membrana mitocondrial externa, el RSP i la membrana nuclear interna. Actua a diferents nivells: protegeix la membrana plasmàtica dels radicals lliures i de la peroxidació, evita la recaptació de calci per part del nucli i inhibeix caspasa-3.

∄ BAX → és una agent pro-apoptòtic que actuarà en les mitocondries, unint-se al porus de transició de permeabilitat mitocondrial i donant lloc a augment de la permeabilitat.

∄ XIAP → és un potent inhibidor de les caspases dependents del citocrom-C, que en el citosol s'uneix a Apaf-1 induint la seva oligomerització i activant la caspasa-9. Tant XIAP com Apaf-1 són dues molècules en les que s'estan centrant els darrers estudis pel seu paper rellevant en la regulació de l'apoptosi (114).

3.5.3. Apoptosi i sistema cardiovascular.

Els treballs que han relacionat el fenomen de l'apoptosi amb el sistema cardiovascular s'han centrat en diferents aspectes, entre els que destaquen:

3.5.3.A Apoptosi i insuficiència cardíaca. Entre els factors que duen a la insuficiència cardíaca (hipertròfia dels miòcits, alteració del metabolisme del calci) es considera la pèrdua progressiva de miocardiòcits com una de les causes més rellevants (115). Alguns estudis han provat de relacionar l'etiologia de la insuficiència cardíaca amb la presència d'apoptosi. Així, Narula i cols. van descriure la presència d'apoptosi en els explants cardíacs de pacients amb cardiopatia dilatada, mentre que aquest fenomen no es trobava en explants de pacients amb cardiopatia isquèmica (116). Malgrat això treballs posteriors han demostrat que el fenomen d'apoptosi es pot trobar en malalties cardíques tan diverses com la cardiopatia isquèmica o la displàssia aritmogènica del ventricle dret (117). Els factors neurohormonals i mecànics que apareixen en la cardiopatia dilatada també s'han considerat com a inductors d'apoptosi; per exemple, en estudis en els que es procedia a lligar l'artèria aorta de rates, es detectava un increment de l'apoptosi amb un pic màxim en el quart dia post-lligadura (118). Katusura i cols. van presentar un estudi en el que van mostrar un augment de l'apoptosi en miocardiòcits aïllats després d'exposició a angiotensina-II (0.9% miòcits tractats amb ANG-II versus 0.2% en miòcits control), obrint la possibilitat de que els efectes beneficiosos en la insuficiència cardíaca dels IECAS i els ARA-II sigui evitant la pèrdua de miocardiòcits (119). Finalment, hi ha alguns treballs

que han focalizat la seva atenció en el factor natriurètic atrial, mostrant com l'exposició a aquest podia augmentar l'índex d'apoptosi del 4,8% al 19% (120).

3.5.3.B Apoptosi i cardiopatia isquèmica. Clàssicament l'infart de miocardi havia estat considerat com un fenomen on predominava la mort cel·lular per oncosis. Actualment hi ha multitud d'estudis que apunten l'apoptosi com un fenomen àmpliament present en l'infart de miocardi. Efectivament, l'apoptosi es troba en els miòcits localitzats en la zona peri-infart (121), en l'anomenada zona de penombra (entre el miocardi sa i el miocardi infartat) on s'ha demostrat una sobre-expressió de proteïnes reguladores com són el BAX i el BCL-2 (122). Models animals han mostrat que l'apoptosi podria contribuir substancialment en la mort cel·lular, inclús en la zona central de l'infart (5%-33% de miòcits són positius per fragmentació del DNA) (123). De fet, el tractament amb un inhibidor de les caspases zVAD.fmk, va mostrar reducció de la zona d'infart en un model amb rates (124).

3.5.4. Apoptosi i miocardiopatia alcohòlica.

Hi ha alguns estudi in vivo que demostren la presència d'un augment de l'apoptosi en miòcits exposats a alcohol a través de trastorns mitocondrials (125). En la present tesis s'estudia la relació entre l'exposició a l'alcohol i la presència d'apoptosi a través de la tècnica TUNEL i l'expressió de BAX i BCL-2, comparant controls i alcohòlics.

3.6. L'ESTRÈS OXIDATIU I LA MIOCARDIOPATIA ALCOHÒLICA.

3.6.1. Introducció al fenomen de l'estrès oxidatiu.

Un radical lliure és una molècula amb un electró desaparellat. En els sistemes biològics els radicals lliures amb un paper més rellevant són els resultants d'addicionar electrons a la molècula de O₂ (126). La reducció completa de O₂ a aigua requereix de quatre electrons i succeeix, de forma predominant, en el mitocondri (95%) per la via de la cadena oxidativa, sense que es produeixin molècules intermèdies que siguin reactives. Hi ha, però, tota una sèrie de fenòmens fisiològics i també alguns processos potencialment patològics, en els que la reducció de la molècula de O₂ es produeix d'electró en electró (reducció univalent). Això dóna lloc a una reducció parcial que genera tot un seguit de molècules intermèdies que inclouen, entre d'altres l'anió superòxid, l'hidrogen peroxidasa i el radical hidroxil, sent aquest darrer una molècula altament activa. Com que aquestes molècules solen ser altament reactives són anomenades conjuntament com molècules reactives d'oxigen (ROS; en anglès). Una exemple de reaccions de les ROS amb altres molècules biològiques serien els fenòmens de robatori d'electrons (oxidació), que podrien donar lloc a trencament d'enllaços, o el robatori d'àtoms d'hidrogen. El resultat de la modificació d'aquestes molècules per part de ROS s'anomena dany oxidatiu. Per tal d'evitar el dany que pot originar ROS hi ha tot un conjunt de mecanismes enzimàtics i no enzimàtics de protecció entre els que destaquen la superòxid dismutasa (SOD), la glutatión reductasa (GR), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GP), la vitamina E i la vitamina C (127).

3.6.2. L'estrès oxidatiu i el sistema cardiovascular.

El balanç radicals lliures/mecanismes antioxidants del cor és fonamental per assegurar una funció cardíaca normal. En general les reserves d'antioxidants són suficients per a protegir el miocardi però hi ha algunes situacions patològiques que poden fer que aquestes siguin insuficients, com són el fenomen d'isquèmia-reperfusió, els processos inflamatoris i l'administració de fàrmacs cardiotòxics. En aquest apartat voldríem destacar els següents.

- a) Fenomen d'isquèmia-reperfusió: els radicals lliures en el fenomen d'isquèmia-reperfusió són generats a l'espai intracel·lular, a l'interstici i a l'espai vascular per diferents tipus de cèl·lules com els miòcits, les cèl·lules musculars llises i els infiltrats de neutròfils. Entre els agents destaquen el peròxid d'hidrogen, el superòxid i radical hidroxil (128). Els sal·licilats reaccionen amb els radicals hidroxil formant un compost no lesiu i per tant ha estat usat tant per a demostrar la presència d'aquest radical en el moment de la reperfusió com per a disminuir el grau de lesió que genera (129). Alguns estudis han provat de bloquejar la producció de radicals lliures combinant la superòxid dismutasa (converteix O_2^- en H_2O_2) amb la catalasa (que converteix la H_2O_2 en aigua); aquestes dos enzims, combinats amb altres agents, s'han assajat per a neutralitzar el radical hidroxil o bé intentar evitar la seva formació mitjançant la quelació del ferro (passant de peròxid d'hidrogen a hidroxil) (130).

b) Hipertròfia miocàrdica: la majoria d'estudis que s'han desenvolupat sobre la d'hipertròfia miocàrdica i l'estrès oxidatiu s'han basat en els models animals en els que es procedia a lligar l'artèria aorta per tal de desenvolupar hipertròfia miocàrdica. Gupta M i PK Singal van demostrar que 12 setmanes després de lligar l'aorta es podia detectar una augment de l'activitat de la SOD i de la GP mentre que el malonaldehid (que tradueix l'índex de peroxidació lipídica) era un 25% inferior en els cors hipertrofiats que en els controls (131). Un altre estudi, realitzat amb miocardi de porcs pigmeus, va mostrar que després de 10 setmanes de lligar l'aorta es detectaven nivells superiors de SOD i de GP així com de GR. Quan es superaven 20 setmanes, moment en el que s'entrava en paràmetres hemodinàmics d'insuficiència cardíaca, la SOD i la GR disminuïen per sota del nivell dels controls. Això semblaria indicar que mentre que la hipertròfia miocàrdica s'associaria amb un increment de l'estat antioxidant la transició a insuficiència cardíaca mostraria un caiguda dels mateixos, encara que l'estudi no va poder determinar si això era causa o efecte (132).

c) Exercici: realitzar un exercici intens ha demostrat estimular la resposta antioxidant del miocardi. Així, en un exercici realitzat a diferents intensitats (55, 65 i 75% del consum màxim d'oxigen) i amb duracions diferents (30, 60 i 90 minuts /dia) s'induïa l'augment de la SOD en el ventricle esquerre després de 10 setmanes d'entrenament, mentre que la catalasa i la GP no semblaven modificar-se (133).

3.6.3. L'estrès oxidatiu i l'alcohol.

La resposta de l'organisme a l'administració aguda i crònica d'alcohol ha evidenciat la generació de radicals lliures (134) que poden conduir a alteracions miocardi (62). Hi ha diferents estudis, basats majoritàriament en models amb animals, que han provat de demostrar els efectes de l'ingesta aguda i crònica d'alcohol en el balanç antioxidant. Un estudi que donava una dosi única de 2g/m/kg a rates va mostrar danys miocàrdic per pèrdua de lactat deshidrogenasa (LDH) que era parcialment reversible amb vitamina E (135). En un altre estudi, en el que la dosi d'etanol s'administrava durant 6 setmanes, es va mostrar descens de la GP i la GP que es recuperava amb una dieta rica en vitamina E (136). En canvi hi ha altres estudis que han postulat poca relació entre l'estrès oxidatiu i la lesió miocàrdica per etanol. Així, en un experiment amb galls d'indi exposat a etanol durant 15 setmanes es va aconseguir generar disfunció ventricular esquerra i dilatació de cavitats però els nivells de SOD, catalasa i GP es van mantenir elevats. Els autors d'aquest article discutien si la troballa podia ser deguda a la diferent reserva d'agents antioxidants deguda a l'espècie estudiada (137). Un altre treball en el que s'administrava etanol en una dieta líquida aportant aquest el 36% de les calories es va comprovar un augment dels nivells miocàrdics de catalasa (138).

En la present tesis intentarem aprofundir en aquest estudis previs evitant dues limitacions fonamentals: nosaltres no usarem models animals, sinó miocardi humà, i el temps d'exposició serà molt més perllongat.

4. HIPÒTESI I JUSTIFICACIÓ DE LA TESI

La fisiopatologia de la miocardiopatia alcohòlica és indiscutiblement multifactorial. Hi ha publicacions prèvies que han aprofundit en els possibles mecanismes que hi intervenen, entre els que caldria destacar alteracions del miòcit, disfunció mitocondrial, alteracions de les proteïnes contràctils, alteracions del metabolisme del calci, trastorns de la cadena oxidativa, alteracions metabòliques i disregulació del sistema neurohormonal.

Les limitacions de la majoria d'estudis, però, rau en que es basen en models animals i que per tant les dades són difícilment extrapolables a l'ésser humà; no només per les diferències òbvies interespècie sinó també per la gran dificultat per a desenvolupar models de consum crònic d'alcohol en els animals d'experimentació. Efectivament és molt difícil assolir un temps d'exposició i/o una dosi acumulada total (kg alcohol consumit/kg pes individu) equiparable al que arriba l'ésser humà.

El nostre grup de recerca, inclòs en el Grup de Recerca de Malalties Relacionades amb l'Alcohol i Patologia Muscular, del Servei de Medicina Interna, dins del grup Neurociències IDIBAPS (Grup de treball 7.04) ha pretès avançar una passa més en la direcció assenyalada per treballs previs. La diferència fonamental amb qualsevol publicació prèvia sobre els efectes del l'alcohol en el miocardi és que s'ha aconseguit defugir les dues limitacions que hem esmentat prèviament. Això ha estat gràcies a l'ampli banc de miocardi humà que el grup ha anat construint al llarg dels darrers 10 anys, amb la inestimable col·laboració del *Transplant Service Foundation* (TSF), i que ens ha permès assajar estudis centrats en models d'exposició crònica i sempre en

miocardi humà de cors no aptes per a trasplantament (observant les normes establertes de caire ètic i de confidencialitat).

La present tesi ha aprofundit en tres mecanismes que participen en el desenvolupament de la miocardiopatia alcohòlica i que estudis previs animals han assenyalat com a destacats en la seva gènesis.

El primer article focalitza l'atenció en la participació dels canals de calci; sent el calci un element clau en la fisiologia cardíaca la present tesi pretén demostrar que l'exposició crònica a alcohol es relaciona amb la sobre-expressió dels canals de calci-L (que són els responsables d'iniciar el complex excitació-contracció) i que aquesta sobre-expressió varia segons si el pacient presenta o no miocardiopatia. El segon article es centra en el fenomen de l'apoptosi i la hipòtesi plantejada és que l'exposició a l'alcohol es relaciona amb un augment dels fenòmens d'apoptosi en el miocardi, és a dir, que l'alcohol podria actuar com un inductor de l'apoptosi i per tant de la pèrdua de miòcits. Finalment, el tercer article, estudia l'estat de l'estrès oxidatiu en relació al consum crònic d'alcohol i en relació a la presència o no de miocardiopatia. La hipòtesi proposada és que l'alcohol és capaç d'alterar l'estat oxidatiu facilitant la lesió miocàrdica per part dels radicals lliures.

5. OBJECTIUS

5.1 OBJECTIUS GENERALS

1. Estudiar en pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol la dinàmica de receptors de calci-L, el fenomen de l'apoptosi i les alteracions en l'estat oxidatiu miocàrdic com a possibles mecanismes de generació de la miocardiopatia alcohòlica.
2. Comparar els tres grups d'estudi, és a dir: 1) Grup control, 2) Grup amb consum crònic excessiu d'alcohol sense miocardiopatia i 3) Grup amb consum crònic excessiu d'alcohol amb miocardiopatia en cada un dels mecanismes proposats, que són: les alteracions dels canals de calci-L, el fenomen d'apoptosi i les alteracions de l'estat oxidatiu.

5.2. OBJECTIUS PARTICULARS

5.2.1 Primer estudi: "Up-regulation of myocardial L-type Ca^{2+} channels in chronic alcoholism". [Fatjó F, Sancho P, Fernández-Solà J, Sacanella E, Estruch R, Bataller R, Nicolás JM.. Up-regulation of myocardial l-type ca^{2+} channel in chronic alcoholism. Department of Internal Medicine and Hepatology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Spain. *Alcohol Clin Exp Res.* (Enviat; pendent acceptació)].

1. Demostrar la presència del fenomen de sobre-expressió de canals de calci tipus-L en pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol.
2. Correlacionar el fenomen de sobre-expressió amb la presència o absència de miocardiopatia alcohòlica.
3. Mesurar la característiques morfomètriques dels diferents grups d'estudi (Grup control, Grup amb consum crònic excessiu d'alcohol sense

miocardiopatia i Grup amb consum crònic excessiu d'alcohol amb miocardiopatia) i la seva relació amb la presència de sobre-expressió dels canals de calci tipus-L.

5.2.2 Segon estudi: "Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy".

[Fernández-Solà J, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, Urbano-Márquez A, Nicolás JM. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Human Pathology*. 2006;37(8):1100-1110].

1. Mesurar la presència d'apoptosi per la tècnica TUNEL en els diferents grups d'estudi (Grup control, Grup amb consum crònic excessiu d'alcohol sense miocardiopatia i Grup amb consum crònic excessiu d'alcohol amb miocardiopatia
2. Valorar l'expressió de BAX i de BCL-2 com a reguladors del fenomen d'apoptosi i la seva relació amb el grau de lesió miocàrdica.

5.2.3. Tercer estudi: "Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism".

[Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badía E, Sacanella E, Estruch R, Nicolás JM. Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(5):864-870].

1. Mesurar l'estat oxidatiu total en el miocardi.
2. Valorar l'activitat enzimàtica de la superòxid dismutasa, la glutatión peroxidasa i la glutatión reductasa en relació als diferents grups d'estudi i a la presència de miocardiopatia.

6. TREBALLS PUBLICATS

6.1.2 UP-REGULATION OF MYOCARDIAL L-TYPE Ca^{2+} CHANNELS IN CHRONIC ALCOHOLISM.

Fató F, Sancho P, Fernandez-Sola J, Sacanella E, Estruch R, Bataller
R, Lluís M, Badia E, Nicolás JM.

Alcohol Clin Exp Res (Enviat).

6.1.3 EVIDENCE OF APOPTOSIS IN ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY.

Fernandez-Sola J, Fató F, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Marquez A.,
Nicolás JM.

Human Pathology. 2006;37(8):1100-1110

6.1.1 MYOCARDIAL ANTIOXIDANT STATUS IN CHRONIC ALCOHOLISM.

Fató F, Fernandez-Sola J, Lluís M, Elena M, Badia E, Sacanella E,
Estruch R, Nicolás JM.

Alcohol Clin Exp Res. 2005;29(5):864-870.

**SOBRE-EXPRESSIÓ EN EL MIOCARDI DELS CANALS DE
CALCI TIPUS-L EN EL CONSUM CRÒNIC D'ALCOHOL.**

**UP-REGULATION OF MYOCARDIAL L-TYPE Ca^{2+}
CHANNELS IN CHRONIC ALCOHOLISM.**

Fatjó F, Sancho P, Fernández-Solà J, Sacanella E,
Estruch R, Bataller R, Lluís M, Badía E, Nicolás JM.

Alcohol Clin Exp Res. 2006

(Enviat. Pendent acceptació)

UP-REGULATION OF MYOCARDIAL L-TYPE CA²⁺ CHANNEL IN CHRONIC ALCOHOLISM

Francesc Fatjó¹, M.D., Pau Sancho², Joaquim Fernández-Solà¹, M.D.,
Emilio Sacanella¹, M.D., Ramón Estruch¹, M.D., Ramón Bataller², M.D. and
Josep-María Nicolás¹, M.D.,

Departments of ¹Internal Medicine and ²Hepatology, Hospital Clínic, Institut
d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona,
Spain.

Word count: Abstract 260, Text: 3,432

Tables: 4

Figures: 2

References: 40

Correspondence:

Josep-María Nicolás, M.D.

Department of Internal Medicine

Hospital Clínic

Villarroel 170

08036 Barcelona

Phone and fax: +34-93-227.55.39

E-mail: nicolas@clinic.ub.es

Supported by research grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias
98/0330, 02/0533 and 02/0535, and Generalitat de Catalunya (2001/SGR-279).

ABSTRACT

Background: Excessive ethanol intake is one of the most frequent causes of acquired dilated cardiomyopathy in developed countries. L-type Ca^{2+} channels, involved in excitation-contraction coupling, are disturbed in animal models of persistent ethanol consumption. This study was designed to evaluate the density and function of myocardial L-type Ca^{2+} channel receptors in organ donors with chronic alcoholism and controls.

Methods: The protein expression of L-type Ca^{2+} -channels was determined with ^3H -(+)-PN 200-110 binding experiments using a specific antibody against the α_1 -subunit in homogenate samples of left-ventricle apex from organ donors: healthy controls (n = 11), chronic alcoholic without cardiomyopathy (n=12) and alcoholics with cardiomyopathy (n=11). Morphometric measurements were performed.

Results: Binding experiments proved an up-regulation of L-type Ca^{2+} channels expression in alcoholics patients compared to controls (B_{max} 3.04 ± 2.8 vs 1.3 ± 0.49 fmol/mg, respectively; $p = 0.012$). This up-regulation was present in the group of alcoholics without cardiomyopathy, and was not seen in those with cardiomyopathy (4.21 ± 3.7 vs 1.77 ± 0.53 fmol/mg, respectively; $p = 0.046$). The cross-sectional area and perimeter of the cells were greater in alcoholics with cardiomyopathy compared to controls and alcoholic patients without (500 ± 87.8 vs 306 ± 74 and $255 \pm 25 \mu\text{m}^2$, respectively; $p < 0.001$ both) as was

perimeter ($78.7 \pm 7.3 \mu\text{m}$ vs 61.5 ± 7.2 and $56.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.001$ both). Binding results did not change after adjusting receptor measurements for cross-sectional area and cell perimeter.

Conclusions: Chronic alcoholism causes an up-regulation of myocardial L-type Ca^{2+} channel receptors, which partially decreases when cardiomyopathy is present.

Key words: ethanol, myocardium, calcium channels, alcoholic cardiomyopathy.

INTRODUCTION

Chronic alcoholic cardiomyopathy is a well-defined entity related to ethanol consumption in a dose-dependent manner and occurs independently of nutritional factors or vitamin deficiencies (Urbano-Marquez et al., 1989; Fernández-Solà et al., 1994,1997). It is characterized by the development of structural and functional changes in the myocardium, most remaining subclinical but manifesting later as low-output dilated cardiomyopathy (Moushmouth and Ali-Mansour.,1991; Urbano-Márquez et al., 1989). The multi-factorial pathogenesis of alcoholic skeletal or cardiac muscle disease has only partially been clarified and some authors have suggested an alteration of calcium homeostasis, especially in L-type voltage-gated calcium channel (VGCCs) expression and regulation (Cofan et al., 1995, 2000; Guppy and Littleton, 1994a).

Cardiac muscle excitation-contraction (E-C) coupling is regulated by elevation of the intracellular Ca^{2+} concentration mediated by the interplay between the VGCCs and ryanodine receptors (RyR_2). Animal models have shown an up-regulation of cardiac VGCCs in mice exposed to acute alcohol consumption (Guppy and Littleton, 1994b). However, these models are not representative of human expression since time and dose of exposure (kg of ethanol/kg weight) in animal models are insufficient to generate chronic cardiomyopathy. In fact, no studies have evaluated the VGCCs and calcium fluxes in chronic alcoholic exposition. The VGCCs are localized in the T-tubular membranes, invaginations of the plasma membranes, and are physically separated from the RyR_2 residing in the junctional sarcoplasmic reticulum (jSR).

The VGCCs are assembled from three tissue-specific isoforms of ζ_1 ($\zeta_{1.1}$, $\zeta_{1.2}$ and $\zeta_{1.3}$) and η (largely the η_2 and η_3 isoforms) while the ν subunit is only present in skeletal muscle (Biel et al., 1991; Hullin et al., 1992). The ζ_1 -subunit contains the binding site for Ca^{2+} -channel antagonists such as dihydropyridines, phenylalkylamines and benzodiazepines and is the responsible for voltage-gated Ca^{2+} movement through the sarcolemma (Flockerzi et al., 1991; Hullin et al., 1993; Tuana and Murphy, 1990). Depolarization of cardiac myocytes is suggested to lead to the opening of the L-type calcium channels with Ca^{2+} influx through the VGCCs, stimulating the opening of the RyR_2 and resulting in a cascade of Ca^{2+} ions released into the cytosol, i.e. calcium-induced calcium release (Cheng et al., 1994; Santana et al., 1996, Wang et al., 2004).

The present study was designed to elucidate the presence of changes in VGCCs expression in human chronic alcoholic cardiomyopathy. Clinical evaluation as well as morphometric studies of cardiac tissue were performed in hearts from organ donors with and without previous history of chronic ethanol intake. The amount and function of VGCCs receptors were measured by radioligand binding experiments with morphometric cell measurements for adjusting receptor density.

MATERIALS AND METHODS

Patient and control selection

Over a three-year period (1999-2002), we consecutively studied hearts from people with brain death of traumatic or cerebrovascular origin who had been considered as organ donors by the heart transplant team of the Hospital Clínic of Barcelona (*Transplant Service Foundation*). Of 94 cadaveric donors younger than 70 years of age, 49 hearts were not suitable for transplantation: 23 cases due to a history of ethanol intake (>60 g/day) and 11 hearts from healthy patients lacking a matched receptor or adequate size. Additionally, 15 hearts were not eligible for transplantation because of heart disease. In all cases ventilatory and hemodynamic parameters were appropriately maintained in an intensive unit care: systolic blood pressure was greater than 100 mmHg, P_aO_2 was always greater than 60 mmHg, pH was maintained between 7.35 and 7.45 and none of the patients required cardiopulmonary resuscitation maneuvers.

None of the ethanol drinkers had clinical data of overt heart failure or any other uncompensated alcohol-related disease. All patients were white Caucasian men of Spanish descent who lived with their families in or around Barcelona and had histories of stable employment. Most were skilled laborers or office workers. None were indigent. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínic and included informed consent from the families of the donors concerning the use of myocardium tissue for this research protocol study. Some of these subjects had participated in a previous study on

heart antioxidant status (Fatjó et al., 2005).

Clinical evaluation

History of ethanol intake was obtained retrospectively by consultation with family members using a structured questionnaire according to the “time-line follow-back method” (Sobell et al., 1979) as previously reported (Urbano-Márquez et al., 1989). Assessment of caloric status was performed as reported elsewhere (Nicolás et al., 2001). Body mass index was determined as the actual body weight relative to the square of the body height (BMI, Kg/m²). Protein malnutrition was assessed by the following parameters obtained before donation: hemoglobin, lymphocyte count, total protein and albumin. An abdominal ultrasonography was performed in all subjects as part of routine assessment for organ donation and an open liver biopsy was obtained from the donors with a history of alcohol misuse.

Cardiac Studies

Symptoms and signs of heart failure were evaluated in consultation with family members of the donors and NYHA functional class was determined according to the Goldman activity scale (Goldman et al., 1981). Chest radiography with measurement of cardiothoracic ratio and conventional electrocardiography were performed in all donors. Bidimensional echocardiography (Hewlett-Packard Sonos 2500, USA) was performed in all cases with a cardio-thoracic ratio greater than 0.48. End-diastolic and end-systolic diameters, the shortening fraction, and left ventricle mass were

measured according to the standards of the American Society of Echocardiography (Gottdiener et al., 2004). The cardiothoracic index and the left-ventricle end-diastolic diameter were correlated ($r = 0.68$, $p < 0.01$). These tests were performed and evaluated by personnel with no knowledge of the alcoholic history of the patients.

Myocardium sample storage

At the time the donor was under cold perfusion, 3 cm of the distal left-ventricle apex were surgically excised (total weight of 4-5 g). The specimen was cut into fragment one of which was processed for further histological analysis. The remaining fragments were immediately frozen under liquid nitrogen, until isotopic studies were performed.

Histological and morphometric studies

Myocardial specimens were processed for routine conventional histology exam, with hematoxyllin-eosin and toluidine-blue staining in semi-thin sections. Two independent observers evaluated the degree of myocardial cell and nuclear hypertrophy, myocytolysis (presence of myofiber disarray or cell vacuolization) and interstitial fibrosis. The amount of interstitial fibrosis (volume fraction of fibrosis) and cardiac muscle cells (volume fraction of the myocytes) were determined morphologically by a previously reported method (Fernández-Solà et al., 1994), and were compared to values of normal controls. Degrees of global histology involvement was graded as mild, moderate or severe according to previously defined criteria (Fernández-Solà et al., 1994). For morphometric

measurements, images were obtained by digital image picture and the cross-sectional area and perimeter of cardiac cells were measured by morphometry with ImageJ 1.32j (National Institute of Health, USA) program. The count was made on at least 5 different fields (magnification 250x) of each sample, with at least 500 cells for field, according to the method described by Sandri et al. (1995).

Homogenate preparation and radioligand binding experiments

Myocardial tissue was chilled in 10 ml ice-cold homogenization buffer (in mmol/L: Tris 20, NaCl 145, MgCl₂ 2). A protease inhibitor, 1 table of Complete® in 50 mL buffer, was added (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Connective tissue was trimmed away and myocardial tissue was minced with scissors and homogenized with a motor driven glass-Teflon homogenizer for 1 min. Homogenate was filtered through two layers of gauze and diluted with ice-cold buffer up to 15 mL total volume and was centrifuged with 1,000 rpm for 15 min at 4°C. The protein concentration of the pellet was measured with the Bradford method (Kruger NJ, 1994) and ice-cold buffer was added to obtain a concentration of 1 mg/mL. The experiments were performed in a total volume of 300µl with incubation at 25°C for 60 min. The reaction was terminated by rapid vacuum filtration through Whatman GF/C filters (Whatman, Clifton, NJ, USA) in a cell harvester (Strakon, Lier, Norway). The filters were immediately washed twice with ice-cold buffer (ethanol 10%, Tris 50mM) and radioactivity was determined in a twinkle-counter (Packard, Camberra Company, Germany). All experiments were performed in duplicate. Dihydropyridine binding sites were

studied using ^3H -(+)-PN 200-110. Non-specific binding of ^3H -(+)-PN 200-110 was defined in the presence of 10 μl cold nitrendipine. The tubes were protected from light during the entire experiment. For all samples Bmax and Kd were calculated using the GraphPad Prism program (Graph Pad Software, Inc., CA). The Kd, expressed in units of moles/liter or molar, is the concentration of ligand which occupies half of the receptors at equilibrium. A small Kd means that the receptor has a high affinity for the ligand and vice versa. Bmax is the total number of receptors, and is expressed by fmol/mg protein. Since quantification of total protein was used to perform experiments and L-type calcium channels are localized in the T-tubular membranes, we calculated the cross-sectional area and transversal perimeter to obtain the number ($\text{Bmax} * \text{area}$; fmol/mg protein/ σm^2) and density of receptors ($[\text{Bmax} * \text{area}]/\text{perimeter}$; (fmol/mg protein/ σm^2)/mcm). With this correction, we ruled out the possibility that the differences of Bmax were a consequence of the morphometric changes among the groups.

Statistics

Standard statistical methods of the SPSS Statistical Analysis System V-10.0 (SPSS, Chicago) were used. Differences between groups were analyzed using ANOVA, Fisher-exact and two-tailed Student's t tests. Correlation studies were obtained by Pearson's correlation coefficient. Since most of the variables followed a normal distribution, data are expressed as mean \pm SD, and a significance level of p lower than 0.05 was used.

Limitations to the study

The present study is restricted to a relatively small number of middle-aged chronic alcoholics of Caucasian origin and controls, due to the difficulty in obtaining human myocardium samples. Since myocardial biopsy was taken only in the left-ventricle apex, this study did not consider architectural or functional changes within different sites of the myocardium. Due to the abstinence from alcohol established in the period comprised from hospital admission to heart donation, acute effects of alcohol on receptor expression activities could not be considered in this study.

RESULTS***Clinical data***

A total of 23 chronic alcohol patients and 11 control organ donors were evaluated. Table 1 shows the epidemiological and clinical data of the patients. The groups of patients were similar in age, and male predominance was observed in the groups of alcoholics and control patients. The main causes of death were cerebrovascular disease in alcoholics and cranial trauma in the control group. Time from hospital admission to organ extraction was similar in the both alcohol group and controls (32 ± 3 versus 30 ± 2 hours, respectively). Chronic alcoholics had presented a mean daily ethanol consumption of 165 ± 43 g during a period of 25.1 ± 5.4 years (lifetime dose of ethanol of 21.3 ± 5.6 Kg ethanol/Kg body weight) (Table 1). The control group presented a maximum daily ethanol intake of 20 g/day. Alcoholic patients reported a greater active

smoking habit with a mean of 35 ± 12 packets-year, compared to control donors ($p < 0.001$).

Evaluation of the clinical history revealed that all control subjects were in NYHA I functional class. Five (22%) out of the 23 chronic alcoholics had NYHA II class and two others (9%) were in NYHA III class. Neither controls nor alcoholics had received any regular medication over the three months prior to admission. Alcoholics presented a greater cardiothoracic index than controls (Table 1). The electrocardiogram was normal in all controls but one who showed signs of left ventricular hypertrophy, being abnormal in 11 alcoholics (48%) who showed changes in ST wave, conduction defects and signs of left-ventricle hypertrophy.

Nutritional data

The nutritional parameters of both groups are reported in Table 2. The BMI was comparable in the two groups studied. Only two subjects with chronic alcoholism exhibited signs of caloric malnutrition. Regarding protein nutritional parameters, alcoholics disclosed a lower mean total serum protein and albumin concentrations compared to controls. Alcoholics showed higher concentrations of aspartate aminotransferase and gammaglutamyl transpeptidase compared to the control group. Serum muscle enzymes were similar in both groups. Abdominal ultrasonography was normal in 10 out of 11 controls. By contrast, 16 out of 23 alcoholics showed a diffuse disruption of liver structure. A liver biopsy was performed in all patients with abnormal ultrasonography, and the histological analysis disclosed 11 cases of fatty liver, 3 with alcoholic hepatitis,

and the remaining 2 had liver cirrhosis (Child-Pugh A stage).

Cardiac evaluation

According to the reported criteria described in the Methods section, 11 chronic alcoholics (48%) had dilated cardiomyopathy (cardiothoracic index \geq 0.48). Table 3 shows cardiac functional data and ethanol intake in chronic alcoholic donors according to the presence or absence of dilated cardiomyopathy. All alcoholics with NYHA class II-IV had enlarged hearts. No difference in nutritional data was observed among the subgroups of patients. In concordance to previous studies, alcoholic patients with dilated cardiomyopathy consumed a significantly greater daily and lifetime ethanol intake compared to those without heart enlargement.

Myocardial histological analysis

Histological evaluation of myocardial samples from controls was normal, except for slight signs of myocyte hypertrophy and interstitial fibrosis in one specimen. Patients with cardiomyopathy had myocyte cell and nuclear hypertrophy, and two-thirds demonstrated interstitial fibrosis. By contrast, patients without cardiomyopathy only exhibited myocyte abnormalities in one-fourth of the cases.

Morphometric studies

Morphometric measurements of the cardiac myocytes (Table 4) showed similar cross-sectional area and perimeter between the control group and

alcoholic donors (306 ± 74 vs $372 \pm 136 \mu\text{m}^2$, and 61.5 ± 7.2 vs $67 \pm 12 \mu\text{m}$, respectively) When considering the subgroups of donors, subjects with cardiomyopathy showed a greater cross-sectional area and perimeter than those without cardiomyopathy (500 ± 88 vs $255 \pm 25 \mu\text{m}^2$, and 79 ± 7 vs $56 \pm 2.8 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.0001$ both) and controls (500 ± 88 vs $306 \pm 74 \mu\text{m}^2$, and 79 ± 7 vs $61 \pm 7 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.0001$ both).

Isotopic binding studies

We measured the B_{max} and K_d of L-VGCC by isotopic binding techniques using ^3H -(+)-PN 200-110 as a radioligand and antibody against α_1 -subunit of the sarcolemmal L-type calcium channel was obtained in control and alcoholic groups (Table 4).

When evaluating the amount of receptors (B_{max}) between the control group and alcoholic donors we observed that B_{max} was greater in alcoholic donors than in control group ($B_{\text{max}} 3.04 \pm 2.8$ vs $1.3 \pm 0.5 \text{ fmol/mg}$; $p = 0.012$). When considering the subgroups of donors, the subjects without cardiomyopathy showed a higher amount of VGCCs than those with ($B_{\text{max}} 4.1 \pm 3.7$ vs $1.7 \pm 0.5 \text{ fmol/mg}$; $p = 0.046$) and controls ($B_{\text{max}} 4.1 \pm 3.7$ vs $1.33 \pm 0.5 \text{ fmol/mg}$; $p = 0.022$). No statistical differences were found between the control group and alcoholics with cardiomyopathy ($B_{\text{max}} 1.33 \pm 0.5$ vs $1.77 \pm 0.5 \text{ fmol/mg}$).

Regarding to the dissociation constant (K_d) of L-Calcium Channel, no differences were observed between the control and alcoholic groups ($K_d 9.1 \pm 7.5$ vs $15 \pm 9.1 \text{ nM}$; $p = \text{n.s.}$). In contrast, when considering the subgroups of

donors, subjects without cardiomyopathy showed a Kd greater than those with (19.6 ± 10.6 vs 10.1 ± 4.1 nM; p = 0.011) and controls (19.6 ± 10.6 vs 9.1 ± 7.5 nM; p = 0.018). No statistical differences were seen between the control group and alcoholics with cardiomyopathy (Kd 9.1 ± 7.5 vs 10.1 ± 4.1 nM).

In the present study, the mean cross-sectional area and the transversal perimeter of myocytes differed among the groups studied. Since total protein was used to perform measurements and L-type calcium channels are localized in the T-tubular membranes, we calculated the number and density of receptors to discard the possibility that differences in Bmax were a consequence of the significant morphometric changes among the groups.

The receptor number by area was higher in alcoholics with cardiomyopathy compared to controls (79508±12744 versus 42887±14400 fmol/mg/mcm², p<0.01). Receptor density by perimeter was also higher in alcoholics with or without cardiomyopathy than controls, being higher in alcoholics without cardiomyopathy than in those with cardiomyopathy. (controls 689 ± 204, alcoholics with cardiomyopathy 1121 ± 253, alcoholic without cardiomyopathy 1426 ± 281 ([fmol/mg/mcm²]/perimeter). P <0.05).

DISCUSSION

The pathogenic mechanisms induced by the toxic effect of alcohol on skeletal and cardiac striate muscle are multifactorial, and have been previously reported in several clinical and experimental studies (Fernandez-Sola et al., 1997). However, clinical studies are limited because of the difficulty in obtaining

human myocardial samples from chronic alcohol consumers. In experimental studies, the limitation was to achieve a sufficient lifetime dose of ethanol consumption in the animals (Kg of ethanol consumed per Kg of body weight) to develop a situation of dilated cardiomyopathy comparable to what occurs in the human model (Urbano-Márquez et al., 1989).

One of the main mechanisms involved in the effect of alcohol on the myocardium is the disruption of intracellular calcium concentration and membrane calcium transients, where the role of the L-type Ca^{+2} channel activity is relevant (Morgan JP, 1991; Thomas et al. 1989). In animal models, acute alcohol exposure induces a dose-dependent descent in intracellular calcium-ion transient (Cofan et al 1995 and 2000). An up-regulation of L-type calcium channels in hearts of ethanol-dependent rats has also been described (Guppy et al,1995). In clinical studies, disruption of $[\text{Ca}^{2+}]$ regulating mechanisms has been reported in dilated cardiomyopathy (Beuckelmann and Erdmann, 1992, Beuckelmann et al, 1992, 1997; Schroder et al, 1998) as well as in terminal heart failure (Beuckelmann et al, 1992; Feldman et al, 1987; Gwathmey et al, 1987). However, no study has focused on the role of L-type Ca^{2+} channels in chronic alcohol consumption and alcohol-induced dilated cardiomyopathy.

The present study evaluates myocardial L-type Ca^{2+} channel receptor function and density in myocardial tissue from 23 human organ donors with chronic alcoholic consumption. We considered the effect of the amount of alcohol consumption and the presence of cardiomyopathy in these subjects in comparison to non-alcoholic control donors. Thus, the reported alcohol consumption in this study was maintained along a mean period of 25.1 years

with a total lifetime dose of ethanol of 21.3 kg ethanol/Kg body weight. Both values are relatively high and impossible to reach in animal models of chronic alcoholism.

The main results of this study confirmed an up-regulation of L-type Ca^{2+} channels in chronic alcoholic consumer donors compared to control donors. This up-regulation was evident in chronic alcohol consumers without cardiomyopathy, but was not seen in the presence of alcohol-induced cardiomyopathy. In fact, B_{max} and K_d values, were significantly higher in those alcoholics without cardiomyopathy than in those with cardiomyopathy, reflecting the up-regulation effect on the L-type Ca^{2+} channel. In fact, some authors have previously pointed an increment in channel availability (K_d), and the open probability of receptor in dilated hearts (Schroeder et al., 1998; Schwinger et al., 1990, 1992).

Morphometric study of the myocardium showed a major myocyte area and perimeter in alcohol consumers with cardiomyopathy than in controls and alcoholics without cardiomyopathy. This was interpreted as an inaccurate mechanism of alcohol exposure through myocardial hypertrophy. Since evaluation of L-type Ca^{2+} -channel receptors was related to total protein values, we corrected these measurements according to the area and perimeter of myocytes, to avoid muscle areas without receptors. Therefore, receptor density was greater in alcoholics without cardiomyopathy and was similar or decreased when donors with alcohol consumption develop cardiomyopathy.

These results demonstrate that up-regulation of L-type Ca^{2+} channels is an adaptative mechanism of heart myocytes to the acute effects of ethanol. This

acute exposure decreases i.c Calcium transients and [Ca]_i concentration (Cofan et al., 1995,2000), an effect that remains until heart damage appears. Lately, the presence of heart damage makes this up-regulation mechanism ineffective, increasing the alcohol-induced functional damage to the myocardium, and decreasing its contractile function.

This effect of up-regulation of the L-type Ca²⁺ channels observed in myocardium is also present in other organs such as cortical neurons of mice exposed to ethanol (Katsura et al, 2005; Mohri et al., 2003; N'Gouerno and Murad, 2003), as well as in Na⁺/Ca⁺⁺ myocardial exchanger (Flesch et al., 1996), Similarly, a down-regulation of myocardial beta-receptors has been observed in dilated cardiomyopathy (Takahashi et al, 1992; Rasmussen et al, 1990; Schwinger et al, 1990). However, none of these studies has been performed in the context of chronic alcohol consumption.

In summary, we observed an up-regulation of L-type Ca²⁺ channels in the myocardium of organ donors with chronic alcohol consumption without dilated cardiomyopathy. This effect may be an adaptative mechanism of the myocardium to the acute effects of ethanol, that decreases i.c [Ca] transients. This adaptation mechanism seems to disappear when these subjects develop structural cardiac damage. However, the significance of the disappearance of the up-regulation of L-type Ca²⁺ channel receptors as a cause or consequence of heart damage should be elucidated in future studies.

REFERENCES

- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85: 1046-1055.
- Beuckelmann DJ, Erdmann E (1992). Ca^{2+} -currents and intracellular $[Ca^{2+}]_i$ -transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium. *Bas Res Cardiol* 87: 235-243.
- Beuckelmann DJ. (1997) Contributions of Ca^{2+} -influx via the L-type Ca^{2+} -currents and Ca^{2+} - release from the sarcoplasmic reticulum to $[Ca^{2+}]_i$ -transients in human myocytes. *Bas Res Cardiol* 92: 105-110.
- Biel M, Hullin R, Freudner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V, Hofmann F. (1991) Tissue-specific expression of high voltage activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur J Biochem* 200:81-88.
- Cheng CP, Noda T, Nordlander M, Ohno M, Little WC (1994). Comparison of effects of dihydropyridine calcium antagonists on left ventricular systolic and diastolic performance. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1232 - 1241.
- Cofan M, Fernández-Solá J, Nicolas JM, Poch E, Urbano-Marquez A (1995). Ethanol decreases basal cytosolic-free calcium concentration in cultured skeletal muscle cells. *Alcohol Alcohol* 30:617-21.
- Cofan M, Nicolas JM, Fernández-Solá J, Robert J, Tobias E, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Marquez A. (2000) Acute ethanol treatment decreases intracellular calcium-ion transients in mouse single skeletal muscle fibres in vitro. *Alcohol Alcohol* 35:134-138.

- Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M., Elena M., Badía E., Sacanella, E., Estruch R., Nicolás JM (2005). Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 29:864-70.
- Feldman MD, Copelas L, Gwathmey JK, Phillips P, Warren SE, Schoen FJ, Grossman W, Morgan JP (1987). Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 75:331-339.
- Fernández-Solà J, Estruch R, Grau JM, Paré JC, Rubin E, Urbano-Márquez A (1994). The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 120: 529-536.
- Fernández-Solà J, Estruch R, Urbano-Márquez A (1997). Alcohol and Heart Muscle Disease. *Addiction Biology* 2: 9-17.
- Flesch M, Pütz F, Schwinger RHG, Böhm M (1996). Evidence for a functional relevance of an enhanced expression of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger in the failing human myocardium. *Circulation* 94:992-1002.
- Flockerzi V, Bosse E, Biel M, Hullin R, Hofmann F (1991). High voltage activated calcium channels: molecular composition and function. *Eur Heart J* 12:95-98.
- Goldman L, Hashimoto B, Cook F, Loscalzo A (1981). Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation* 64: 1227-1234.
- Guppy LJ, Littleton JM (1994a). Binding characteristics of the calcium channel antagonist [3H]-nitrendipine in tissues from ethanol-dependent rats. *Alcohol Alcohol* 29:28-93.
- Guppy LJ, Littleton JM (1994b). The time course of up-regulation and down-

regulation of dihydropyridine binding sites during the development of physical dependence on ethanol. *Proc West Pharmacol Soc* 37:77-80.

- Guppy LJ, Crabbe JC, Littleton JM. (1995) Time course and genetic variation in the regulation of calcium channel antagonist binding sites in rodent tissues during the induction of ethanol physical dependence and withdrawal. *Alcohol Alcohol* 30:607-615.

- Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987). Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61:70-76.

- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* 11:885-890.

- Hullin R, Biel M, Flockerzi V, Hofmann F (1993). Tissue specific expression of calcium channels. *Trends Cardiovasc Med* 172:89-95.

- Katsura M, Torigoe F, Hayashida S., Honda T., Tsujimura A., Ohkuma S (2005). Ethanol physical dependence is accompanied by up-regulated expression of L-type high voltage-gated calcium channel alpha1 subunits in mouse brain. *Brain Res* 1039:211-215.

- Kruger NJ (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32:9-15.

- Mohri Y., Kaytsura M., Shuti K., Tsujimura A., Ishii R., Ohkuma S (2003) L-type high voltage-gated calcium channels cause an increase in diazepam binding inhibitor mRNA expression after sustained exposure to ethanol in mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 12;113:52-56.

- Morgan JP (1991). Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N Engl J Med* 325:625-632.
- Moushmouth B, Ali-Mansour P (1991). Alcohol and the heart. The long-term effects of alcohol on the cardiovascular system. *Arch Intern Med* 151: 36-42.
- N'Gouemo, Morad M (2003). Ethanol withdrawal seizure susceptibility is associated with upregulation of L- and P-type Ca²⁺ channel currents in rat inferior colliculus neurons. *Neuropharmacology* 45:429-437.
- Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Fatjo F, Casamitjana R, Bataller R, Sacanella E, Tobias E, Badia E, Estruch R (2001). Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 25:83-8.
- Rasmussen RP, Minobe W, Bristow MR (1990). Calcium antagonist binding sites in failing and non-failing human ventricular myocardium. *Biochem Pharmacol* 39:691-696.
- Santana LF, Cheng H, Gomez AM, Cannell MB, Lederer WJ (1996). Relation between the sarcolemmal Ca²⁺ current and Ca²⁺ sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res* 78:166-171.
- Sandri M, Carrato U, Podhorska-Okolow M, Rizzi C, Arslam P, Monti D, Franceschi C (1995). Apoptosi, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 373:291-295.
- Schröder F, Handrock R, Beuchkelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RHG, Weil J, Herzig S (1998). Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with non-failing human ventricle. *Circulation* 98:969-976.
- Schwinger RHG, Böhm M, Erdmann E (1990). Effectiveness of cardiac

- glycosides in human myocardium with and without “downregulated” B-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 15:692-697.
- Schwinger RHG, Böhm M, Erdmann E (1992). Inotropic and lusitropic dysfunction in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 123:116-128.
 - Sobell LC, Maisto SA, Sobell MB, Cooper AM (1979). Reliability of alcohol abusers' self-reports of drinking behavior. *Behav Res Ther* 17:157-60.
 - Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, - Marsh JD, Izumo S. (1992). Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin Invest* 90:927-35.
 - Thomas AP, Sass EJ, Tun-Kirchmann TT, Rubin E (1989). Ethanol inhibits electrically-induced calcium transients in isolated rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 21:555-565.
 - Tuana BS, Murphy BJ (1990). Biochemical analysis of L-type calcium channels from skeletal and cardiac muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 68:1482-1488.
 - Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont L (1989). The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 320: 409-411.
 - Gottdiener JS, Berdnarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, Manning WJ, Morehead A, Kitzman D, Oh J, Quinones M, Schiller NB, Stein JH, Weissman NJ (2004). American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr* 17: 1086-1119.
 - Wang MC, Dolphin A, Kitmitto A (2004). L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Lett* 564: 245-250.

Table 1.- Epidemiological and clinical data of chronic alcoholics and control donors.

	Controls (n = 11)	Alcoholics(n23)
Age (years)	57.1 ± 13.2	52.6 ± 10.3
Gender (Male/Female)	4 / 7	19 / 4 ³
Causes of death		
Cranial trauma (n, %)	6 (54)	5 (22)
Cerebrovascular disease (n, %)	5 (45)	16 (69)
Other causes (n, %)	0	2 (9)
Time from admission to donation (hours)	30 ± 2	32 ± 3
Active smokers (n, %)	2 (18)	21 (91) ⁵
Daily alcohol intake (grams)	10 ± 2	165 ± 43 ⁵
Duration of ethanol intake (years)	5.5 ± 1.4	25.1 ± 5.4 ⁵
Lifetime dose of ethanol (Kg ethanol /Kg body weight)	0.3 ± 0.1	21.3 ± 5.6 ⁵
NYHA function (n, %)		
Class I	11 (100)	16 (69)
Class II	0	5 (22)
Clas III-IV	0	2 (9)
Cardiothoracic index	0.48 ± 0.01	0.54 ± 0.06 ⁴
Left-ventricle ejection fraction (%) ¹	61 ± 3	46 ± 9 ⁴
Electrocardiogram (abnormal cases, %) ²	1 (9)	11 (48)
Liver echosonography (abnormal, %)	1 (9)	16 (70)

Data expressed as mean ± standard deviation. ¹ Left-ventricle ejection fraction was obtained in 30 subjects. ² Abnormal electrocardiogram defined in presence of rhythm disturbances, conduction defects, signs of left ventricular hypertrophy or abnormal repolarization. ³ P = 0.01, ⁴ P < 0.01 and ⁵ P < 0.001 compared to controls.

Table 2.- Biochemical and nutritional data of alcoholic and control donors

	Controls (11)	Alcoholics (23)
Body mass index (Kg/m ²)	25.8 ± 3.4	26.7 ± 4.4
Total protein (g/L)	62.8 ± 10.1	56.3 ± 8.5 ¹
Albumin (g/L)	36.2 ± 8.0	28.0 ± 6.7 ²
Aspartate aminotransferase (UI/L)	36.8 ± 17.0	60.8 ± 40.5 ²
Alanine aminotransferase (UI/L)	24.0 ± 7.0	38.3 ± 23.0
Gammaglutamyl transpeptidase (UI/L)	23.6 ± 15.2	110.0 ± 12.5 ³
Bilirubin (mg/dL)	0.89 ± 0.44	1.05 ± 0.91
Creatine kinase (UI/L)	174 ± 138	274 ± 130
Lactate dehydrogenase (UI/L)	546 ± 197	438 ± 180
Leukocyte count (x10 ¹² /L)	9.95 ± 2.63	11.49 ± 2.98
Lymphocyte count (x10 ¹² /L)	1.13 ± 0.77	1.13 ± 0.58
Hemoglobin (g/L)	117 ± 12	123 ± 19
Platelet count (x 10 ⁹ /L)	186 ± 62	149 ± 61
Prothrombin activity (%)	72.9 ± 14.5	75.0 ± 20.9

Data expressed as mean ± standard deviation. ¹ P < 0.05, ² P = 0.01, and ³ p < 0.001 compared to controls.

Table 3.- Myocardial functional data and ethanol intake according to the presence of cardiomyopathy in alcoholic donors.

	Alcoholics without CMP (n = 12)	Alcoholics with CMP (n = 11)
Cardiothoracic index	0.48 ± 0.02	0.59 ± 0.06 ²
Left-ventricle ejection fraction (%) ¹	59 ± 3	38 ± 6 ²
Abnormal ECG (n, %)	5 (42)	6 (55)
Liver echosonography (abnormal, %)	7 (58)	9 (82)
Liver cirrhosis (n, %)	1 (8)	1 (9)
Daily ethanol intake (grams)	146 ± 36	188 ± 51 ⁴
Period of ethanol intake (years)	24.5 ± 5.6	25.3 ± 5.3
Lifetime dose of ethanol (Kg ethanol/Kg body weight)	19.2 ± 6.3	23.3 ± 4.9 ⁴

Data expressed as mean ± standard deviation. ¹ Left-ventricle ejection fraction was obtained in 21 subjects. ² P < 0.001 and ³ P < 0.01 compared to alcoholics without cardiomyopathy, for each group. ⁴ P < 0.05.

CMP: cardiomyopathy

Table 4.- Morphometric measurements and isotopic binding studies in cardiac myocytes of alcoholics and control donors.

	Controls (n=11)	Alcoholics without CMP (n = 12)	Alcoholics with CMP (n = 11)
Area (mcm ²)	307 ± 74	255 ± 25 ^{ΦΦ}	500 ± 87 ^{^^}
Perimeter (μm)	61.5 ± 7.2	56.5 ± 2.8 ^{ΦΦ}	78.7 ± 7 ^{^^}
Bmax (fmol/mg protein)	133 ± 49 *	421 ± 37 ^Φ	177 ± 53
Kd (nM)	9.1 ± 7 *	19.6 ± 11 ^Φ	10.1 ± 4
Receptors number by area (fmol/mg/mcm ²)	42887± 14400**	79508 ± 12744	89479 ± 21988 ^{^^}
Receptors density ([fmol/mg/mcm ²]/ perimeter)	689±204 **	1426±281 ^Φ	1121±253 ^{^^}

CMP: cardiomyopathy

Data expressed as mean ± standard deviation.

* p<0.05 comparing control group vs. alcoholics without CMP group. **

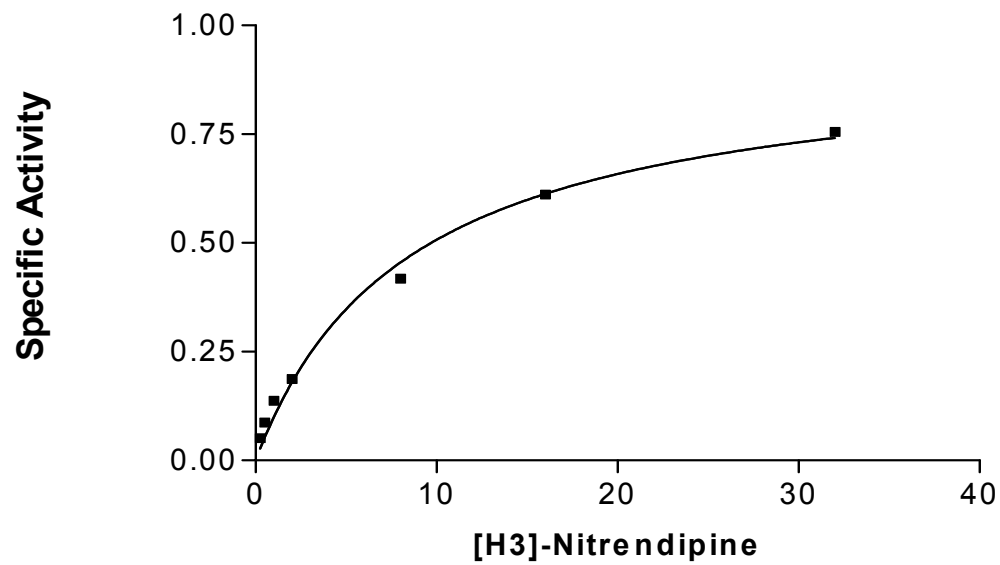
p<0.01

[^] p<0.05 comparing controls vs. alcoholics with CMP. ^{^^} p<0.01

^Φ p<0.05 comparing alcoholic without CMP vs. alcoholics with CMP.

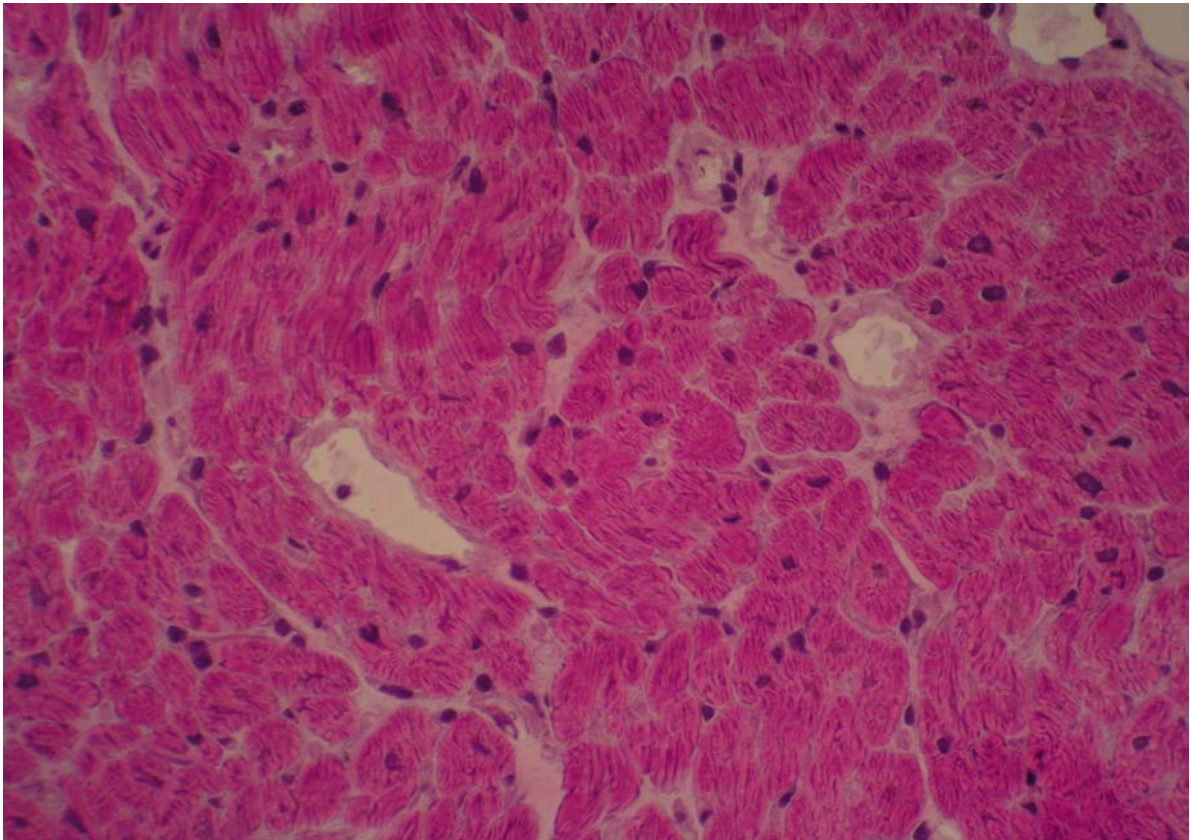
^{ΦΦ} p<0.01 comparing alcoholics without CMP vs. alcoholic with CMP.

Figure 1: Specific activity with respect to different nitrendipine concentrations.



Specific activity (specific binding) was obtained as the difference between total and non-specific binding. Equilibrium-specific binding at a particular radioligand concentration equals fractional occupancy times the total number of receptor (B_{max}).

Figure 2: Myocardial section corresponding to a heart donor with a history of alcohol consumption without alcoholic cardiomyopathy. (Hematoxyllin-Eosine staining x 250)



Images for morphometric measurements were obtained by digital images and cross-sectional area and perimeter of cardiac cells were measured by morphometry with the ImageJ 1.32j program. The count was made on at least 5 different fields (magnification 250x) of each sample, with at least 500 cells per field.

RESUM DE L'ARTICLE: "Up-regulation of myocardial L-type Ca^{2+} channels in chronic alcoholism".

En el present estudi s'ha estudiat els canvis en l'expressió en la membrana del miocit dels canals de calci tipus-L en relació al consum crònic excessiu d'alcohol i a la presència de miocardiopatia alcohòlica.

S'ha mesurat per un mètode de binding amb ^3H -(+)-PN 200-100 (triti) l'expressió de canals de calci tipus-L en mostres d'àpex de miocardi humà (no aptes per a trasplantament) de donants. També s'han realitzat mesures morfomètriques del perímetre i l'àrea dels miòcits. El grup d'estudi ha estat: 11 controls, 12 pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol sense MCPA i 11 pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol amb MCPA.

El grup de pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol sense MCPA han mostrat un sobre-expressió dels canals de calci tipus-L respecte als controls ($p < 0.01$). Quan s'ha comparat als dos grups d'alcohòlics s'ha evidenciat que la sobre-expressió es troba únicament en el grup sense MCPA ($p = 0.046$). Per altre banda, tot i que les mesures morfomètriques han establert un perímetre i una àrea superior pel grup de pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol i MCPA respecte el grups sense MCPA i els controls ($p < 0.001$ ambdós), aquesta dada no ha afectat a la determinació de la sobre-expressió dels canals de calci tipus-L un cop fets els ajustaments adients.

Concloem, doncs, que en els pacients que presenten un consum crònic excessiu d'alcohol però que no han desenvolupat una MCPA hi ha un sobre-expressió de canals de calci tipus-L que no s'evidencia un cop s'instaura la miocardiopatia alcohòlica.

**EVALUACIÓ DE L' APOPTOSI EN LA
CARDIOPATIA ALCOHÒLICA**

EVIDENCE OF APOPTOSIS IN
ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY.

Fernández-Solà J, **Fatjó F**, Sacanella E, Estruch R, Bosch X,

Urbano-Márquez A., Nicolás JM.

Human Pathology. 2006;37(8):1100-1110



Original contribution

Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy[☆]

Joaquim Fernández-Solà MD, Francesc Fatjó MD, Emilio Sacanella MD,
Ramón Estruch MD, Xavier Bosch MD,
Alvaro Urbano-Márquez MD, José-María Nicolás MD*

*Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer),
University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain*

Received 18 November 2005; revised 9 March 2006; accepted 29 March 2006

Keywords:

Apoptosis;
Alcoholism;
Hypertension;
Dilated cardiomyopathy

Summary Apoptosis is a mechanism of cell death implicated in the pathogenesis of alcohol-induced organ damage. Experimental studies have suggested alcohol-mediated apoptosis in the cardiac muscle, and there is evidence of skeletal muscle apoptosis in long-term high-dose alcohol consumers. The relation between skeletal and cardiac muscle damage in alcoholism led us to consider the pathogenic role of apoptosis in alcoholic dilated cardiomyopathy. We evaluated apoptosis in the hearts of individuals with long-term alcoholism ($n = 19$), of those with long-standing hypertension ($n = 20$), and of those with no known disease as control subjects ($n = 7$). Alcohol consumption measurement, heart function evaluation, and myocardial immunohistochemical and morphometric analysis were performed. Apoptosis was evaluated with deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling assay, and BAX and BCL-2 expressions were used to detect induction of and protection from proapoptotic mechanisms, respectively. Hearts from patients with a history of alcoholism showed apoptotic indexes similar to those of organs from hypertensive donors. Subjects with structural heart damage of alcoholic or hypertensive origin showed higher apoptotic indexes in deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, BAX, and BCL-2 assays as compared with control subjects ($P < .001$ for all). Moreover, New York Heart Association class I alcoholic patients displayed higher BAX and BCL-2 expressions as compared with control subjects. We conclude that apoptosis is present to a similar degree in the heart muscle of high-dose alcohol consumers and long-standing hypertensive subjects and is related to structural damage. Proapoptotic mechanisms are activated in alcoholic patients without heart damage.

© 2006 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

High-dose alcohol consumption has been related to the development of dilated cardiomyopathy in a lifetime cumulated dose-dependent manner [1-3]. Because of the widespread consumption of alcohol, alcoholic heart muscle disease is one of the most frequent causes of acquired

[☆] This study was supported by research grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (98/0330, 02/533, and 02/535) and from Generalitat de Catalunya (CUR 2001/SGR-279).

* Corresponding author.

E-mail address: nicolas@clinic.ub.es (J.-M. Nicolás).

nonischemic dilated cardiomyopathy in developed countries [4], affecting as many as 13% of excessive alcohol consumers [1]. Most cases remain asymptomatic for a long time, being detectable only by cardiac function studies, which evidence diastolic left ventricular dysfunction initially and systolic left ventricular dysfunction subsequently [5]. As the disease progresses, however, patients frequently present with overt congestive heart failure and dysrhythmias and have a high risk of facing sudden death [3,4]. The disease progresses if heavy alcohol consumption is maintained but fortunately ameliorates on abstinence or controlled drinking [6].

The mechanisms of alcohol-induced myocardial damage are multifactorial, with disruption of membrane composition, disturbances in excitation-contraction coupling mechanisms as well as in energy and protein turnover, and changes in mechanisms of genetic control being the most frequently involved, often appearing synchronously [7,8]. As a consequence, myocyte damage appears and cell loss with interstitial fibrosis occurs. This myocyte loss has long been attributed to necrosis. To date, no study has reported on myocyte apoptosis in alcoholic dilated cardiomyopathy. As described in other cardiomyopathies, however, myocyte apoptosis may play a role in the development of structural heart damage [9-11]. We therefore decided to test the hypothesis that apoptosis is involved in the pathogenesis of alcohol-induced heart disease. To discern whether ethanol consumption or the presence of structural heart muscle damage is related to apoptosis, we compared alcoholic and hypertensive subjects.

2. Materials and methods

2.1. Patient and control subject selection

Over a 3-year period, we consecutively studied hearts from subjects who suffered brain death of either traumatic or cerebrovascular origin and had initially been considered suitable as organ donors by the transplant team of the Hospital Clinic of Barcelona. Of 104 hearts from donors younger than 70 years, 58 were not suitable for transplantation. Of these latter organs, 7 specimens from patients with heart disease (5 with arterial disease and 2 with valvular disease), 3 from individuals with concomitant hypertension, and 2 that were not adequately cryopreserved were excluded. We finally included 20 subjects with longstanding hypertension and 19 with a history of ethanol intake of 60 g/d or higher. In addition, 7 hearts from previously healthy persons were not eligible for implantation because of lack of a matched recipient or size inadequacy; these donors were treated as control subjects.

All patients had been admitted to the intensive care unit, and ventilatory and hemodynamic parameters were appropriately maintained at normal values throughout hospitalization: PaO₂, >60 mm Hg; systolic blood pressure,

>100 mm Hg; and arterial pH, within the reference range. Use of pressor or inotropic agents, hormones, and electrolytes was recorded. None of the patients required in-hospital cardiopulmonary resuscitation maneuvers. All patients were whites of Spanish descent who lived with their families in or around Barcelona, and none was indigent. The study protocol was approved by the ethics committee of the Hospital Clinic and included informed consent from the families of the donors concerning the use of myocardial tissue for this research study. Twelve of the subjects were included in a previous study on heart antioxidant status.

2.2. Clinical evaluation

A detailed history of ethanol intake was obtained retrospectively by consultation with family members using a structured questionnaire (time-line follow-back method [12]), as previously reported [1,13]. The duration of ethanol intake was calculated in each group as the total cumulated period of alcohol consumption in years, either recent or earlier. Body mass index (BMI) was determined as the actual body weight relative to the square of the body height (kg/m²). Patients were considered to have energy malnutrition if their BMI was lower than 17 kg/m². Protein malnutrition was assessed by the hemoglobin level, lymphocyte count, total protein, and albumin values at admission. As part of the routine assessment for liver donation, abdominal ultrasonography was performed on all subjects. An open liver biopsy specimen was obtained from those donors whose liver was not suitable for donation.

2.3. Cardiac studies

Past and present signs and symptoms of heart failure were evaluated in consultation with medical records and family members of the donors, and the New York Heart Association (NYHA) functional class was determined according to the activity scale set forth by Goldman et al [14]. Chest radiography with measurement of the cardiothoracic index and conventional electrocardiography were performed in all cases. Bidimensional echocardiography was performed (Sonos 2500, Hewlett Packard, Andover, Mass) on 21 patients but on none of the control subjects with a cardiothoracic index of 0.48 or higher. End-diastolic and end-systolic diameters, shortening fraction, left ventricular mass, and ejection fraction were measured according to the standards of the American Society of Echocardiography [15]. We observed a good correlation between the cardiothoracic index and the left ventricular end-diastolic diameter ($r = 0.68$; $P < .01$). The persons who performed and evaluated these tests had no knowledge of the alcoholic history of the donors.

2.4. Myocardial histologic studies

When a donor was under cold perfusion, the distal 3 cm of the left ventricular apex was excised (total weight = 4-5 g)

and cut into fragments, one of which was processed for further histologic analysis. The remaining fragments were immediately frozen under liquid nitrogen until biochemical and apoptosis studies were performed. For histologic studies, specimens were stained with hematoxylin-eosin and toluidine blue in semithin sections. Two independent observers evaluated the degree of myocardial cell and nuclear hypertrophy, myocytolysis (defined as the presence of myofiber disarray or cell vacuolization), and interstitial fibrosis by morphometric measurements. Images were obtained using the US National Institutes of Health digital 1.32j image program, and the cardiac cell cross-sectional area and perimeter were measured. The count was made on at least 5 fields (magnification $\times 250$) of each sample with at least 500 cells per field. Myocyte hypertrophy was accepted when the mean fiber area or diameter significantly exceeded that of the control group (normal value for area = $575 \pm 150 \mu\text{m}^2$; normal value for diameter = $15.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$). Myocyte nuclear hypertrophy was analyzed on a semiquantitative scale (0 to +++) by 2 independent observers evaluating a mean of 1000 nuclei in each patient. Only moderate (++) or severe (+++) grades were accepted as evidence of myocyte hypertrophy.

The amounts of interstitial fibrosis (volume fraction of fibrosis) and cardiac muscle cells (volume fraction of myocytes) were assessed by morphometry as previously reported [13] and were compared with the values of the control subjects (normal value for volume fraction of fibrosis = 0.10 ± 0.06 ; normal value for volume fraction of myocytes = 0.89 ± 0.07). The global histologic involvement was graded as normal, mild, moderate, or severe according to previously defined criteria [1,13].

2.5. Apoptosis immunohistochemical studies

Semithin cryostat sections of $6 \mu\text{m}$ were obtained with an ultramicrotome and fixed with 4% of paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at a pH level of 7.40. After PBS washing, sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 sodium citrate solution for 2 minutes at 4°C . Incubation with deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) was performed using an In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer, Mannheim, Germany) for 60 minutes at 37°C in a wet chamber as described by the manufacturer. After PBS washing, a second incubation with converter-alkaline phosphatase was performed for 30 minutes under the same conditions. The reading was done by adding fast red chromogen for 10 minutes under microscopic control. Incubation with BAX and BCL-2 reagents was performed on cryostat sections of $6 \mu\text{m}$ fixed by ketone at -4°C . After primary antibody exposure (AR 347-5R for BAX and AM 287-5R for BCL-2, Biogenex, San Ramon, Calif), link and labeling reactants were sequentially applied for 20 minutes each (Kit Detection Supersensitive, Biogenex QA000-5L, Biogenex) with a final fast red chromogen incubation for 10 minutes. Negative control slides were tested in all the

procedures using the same process without reagent incubation. Positive control slides were evaluated using human palatal amygdalar tissue in which lymphoid cells express high TUNEL, BAX, and BCL-2 activities.

The apoptotic index (AI) was determined as the percentage of apoptotic cells and calculated by dividing the total number of positively staining heart myocyte nuclei in the TUNEL assay by the total number of nuclei evaluated and multiplying this value by 100, as reported by Narula et al [16] and Paul [17]. Cell nuclei at the edges of the tissues or in the interstitium were not counted. The count was made on at least 5 fields (magnification $\times 250$) of each sample, with at least 500 nuclei per field, according to the method described by Sandri et al [18]. Cells positive for BAX and BCL-2 were identified by the presence of diffuse cytoplasmic hyperenhancement with subsarcolemmal or perinuclear deposition of the reagent and expressed as a percentage of positive to total evaluated cells. Interstitial deposition of these reagents and contraction band necrotic, inflammatory, and peripheral zones of the samples were not considered in the evaluation.

2.6. Statistical analysis

Standard statistical methods were used with the SPSS Statistical Analysis System version 10.0 (SPSS, Chicago, Ill). Differences between groups were analyzed using analysis of variance, Fisher's exact test, and 2-tailed Student's *t* test. Correlation studies were obtained with Pearson's correlation coefficient. Because most of the variables followed a normal distribution, data are expressed as mean \pm SD and a significance level lower than .05 was used.

2.7. Limitations of the study

Because of the difficulty in obtaining human myocardium samples, the present study was restricted to a relatively small number of middle-aged long-term alcoholic white men, individuals with essential hypertension, and control subjects. Given the design of this study, only a retrospective approach to determining the drinking habits of all donors by interviews with family members was possible. Myocardial apoptosis evaluation is limited to the TUNEL, BAX, and BCL-2 assays. Although there are increasing evidence that the TUNEL assay is not specific for apoptosis [19-22], we pursued recommendations to avoid false-positive over-detection, including (1) using enough microscopic fields and identification of the cell type undergoing apoptosis, (2) avoiding cells in the interstitium, (3) using tissue sections treated with deoxyribonuclease (positive control for apoptosis), and (4) comparing the effect of apoptosis in alcohol consumers with that in control donors and those donors with other causes of heart damage such as hypertension. Because the myocardial biopsy specimens were taken only from the left ventricular apex, this study did not consider architectural or functional changes within different sites of the myocardium. Finally, because of the abstinence from

alcohol established in the period from hospital admission to heart donation, the immediate effects of alcohol could not be considered.

3. Results

3.1. Clinical data

Table 1 shows the epidemiologic and clinical data of the patients and control subjects. The groups were similar in age, whereas sex distribution showed a predominance of men among the alcoholic patients and hypertensive patients as compared with the control subjects. Cerebrovascular disease was the main cause of death in the alcoholic patients and hypertensive patients, whereas cranial trauma was the major cause in the control subjects. The time from hospital admission to organ extraction was similar in all 3 groups. Long-term alcoholic patients had a mean daily ethanol consumption of 170 ± 45 g during a period of 26.2 ± 5.1 years (lifetime dose = 22.9 ± 5.8 kg/kg of body weight; Table 1). Alcoholic patients reported a more active smoking habit, with a mean of 35 ± 12 pack-years, as compared with the hypertensive and control donors ($P < .001$ for both).

Hypertensive patients reported a mean duration of high blood pressure of 15 ± 6 years.

Evaluation of clinical history revealed that all control subjects were in NYHA functional class I. Of the 19 alcoholic patients, 4 (21%) were in NYHA class II and 1 (5%) was in NYHA class III. In the group of hypertensive subjects, 5 (25%) were in NYHA class II and 1 (5%) was in NYHA class IV. Neither control subjects nor alcoholic patients had received any regular medication during the 3 months before admission. By contrast, most hypertensive patients received maintenance treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors at the usual doses ($n = 17$) and/or diuretics ($n = 3$). Use of pressor or inotropic agents, hormones, and electrolytes during the hospital stay was similar in all groups. None of the patients required in-hospital cardiopulmonary resuscitation maneuvers. Both alcoholic and long-standing hypertensive patients displayed a greater cardiothoracic index as compared with control subjects (Table 1). The electrocardiogram was normal in all control subjects but 1, who showed signs of left ventricular hypertrophy, and was abnormal in 9 alcoholic patients (47%) and 14 hypertensive patients (70%), with changes in the ST segment, conduction defects, and signs of left ventricular hypertrophy being the most common alterations.

Table 1 Epidemiologic and clinical data of donors

	Control subjects (n = 7)	Alcoholic patients (n = 19)	Hypertensive patients (n = 20)
Age (y; mean \pm SD)	60.7 \pm 10.7	54.2 \pm 14.3	60.6 \pm 11.2
Male/female ratio (n)	3:4	17:2*	12:8
Cause of death [n (%)]			
Cranial trauma	5 (71)	5 (26)	1 (5)**
Cerebrovascular disease	2 (29)	12 (63)	18 (90)
Other	0	2 (11)	1 (5)
Time from admission to donation (h; mean \pm SD)	30 \pm 2	32 \pm 3	29 \pm 3
Active smokers [n (%)]	1 (14)	15 (79) [†]	4 (20)
Daily alcohol intake (g; mean \pm SD)	0	170 \pm 45 [†]	9 \pm 5
Duration of ethanol intake (y; mean \pm SD)	0	26.2 \pm 5.1 [†]	6.0 \pm 2.1
Lifetime dose of ethanol (kg ethanol/kg body weight; mean \pm SD)	0	22.9 \pm 5.8 [†]	0.3 \pm 0.2
NYHA function [n (%)]			
Class I	7 (100)	14 (74)	14 (70)
Class II	0	4 (21)	5 (25)
Classes III and IV	0	1 (5)	1 (5)
Cardiothoracic index (mean \pm SD)	0.48 \pm 0.01	0.54 \pm 0.06**	0.54 \pm 0.05**
Left ventricular ejection fraction (%; mean \pm SD) ^a	60 \pm 3	45 \pm 8**	44 \pm 9**
Electrocardiogram [abnormal cases; n (%)] ^b	1 (14)	9 (47)	14 (70)*
Liver echosonography electrocardiogram [abnormal cases; n (%)]	0	13 (68) [†]	2 (10)

^a Obtained in 36 subjects.

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

* $P = .02$ compared with control subjects.

** $P < .01$ compared with control subjects.

[†] $P < .001$ compared with control subjects and hypertensive patients.

Table 2 Biochemical and nutritional data of patients and apoptosis assays of myocardium

	Control subjects (n = 7)	Alcoholic patients (n = 19)	Hypertensive patients (n = 20)
BMI (kg/m ²)	26.8 ± 2.9	26.4 ± 4.2	27.4 ± 3.3
Total protein (g/L)	63.8 ± 13.0	57.1 ± 7.9*	62.5 ± 8.3
Albumin (g/L)	37.6 ± 9.2	28.6 ± 6.5**	35.3 ± 7.7
Aspartate aminotransferase (IU/L)	43.0 ± 21.2	60.5 ± 30.5**	28.3 ± 14.6
Alanine aminotransferase (IU/L)	22.5 ± 9.4	43.5 ± 28.2	23.0 ± 22.9
Gamma-glutamyl transpeptidase (IU/L)	16.8 ± 9.8	94.9 ± 95.8***	46.0 ± 51.7
Bilirubin (mg/dL)	0.83 ± 0.42	1.11 ± 1.01	1.15 ± 1.02
Creatine kinase (IU/L)	218 ± 159	285 ± 275	211 ± 215
Lactate dehydrogenase (IU/L)	797 ± 543	433 ± 179	436 ± 201
Leukocyte count (×10 ¹² /L)	10.53 ± 2.70	11.92 ± 3.08	11.08 ± 3.72
Lymphocyte count (×10 ¹² /L)	1.42 ± 0.82	1.42 ± 0.62	0.89 ± 0.75
Hemoglobin level (g/L)	117 ± 17	121 ± 24	123 ± 21
Platelet count (×10 ⁹ /L)	141 ± 60	167 ± 58	181 ± 47
Prothrombin index	80.7 ± 17.3	71.8 ± 21.9	81.0 ± 17.2
TUNEL (% of myocardial cells)	2.7 ± 1.5	3.8 ± 3.5	4.0 ± 3.0
BAX (% of myocardial cells)	3.8 ± 4.4	12.5 ± 10.5 [†]	14.9 ± 13.5 [†]
BCL-2 (% of myocardial cells)	2.7 ± 2.0	9.7 ± 8.1 [†]	11.7 ± 11.3 [†]

NOTE. Data are expressed as mean ± SD.

* $P < .05$ compared with control subjects and hypertensive patients.

** $P = .01$ compared with control subjects and hypertensive patients.

*** $P < .001$ compared with control subjects and hypertensive patients.

[†] $P = .04$ compared with control subjects.

3.2. Nutritional data

The BMI was similar in all groups (Table 2). Only 2 subjects with long-term alcoholism and 1 subject with hypertension exhibited borderline signs of energy malnutri-

tion. The alcoholic patients had lower mean total serum protein and albumin concentrations as compared with the other groups ($P < .05$ for all). In addition, alcoholic patients exhibited higher concentrations of serum aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase as compared

Table 3 Myocardial functional data and apoptosis activities according to presence of cardiomyopathy

	Alcoholic patients without CMP (n = 10)	Alcoholic patients with CMP (n = 9)	Hypertensive patients without CMP (n = 8)	Hypertensive patients with CMP (n = 12)
Cardiothoracic index (mean ± SD)	0.48 ± 0.02	0.59 ± 0.04**	0.49 ± 0.01	0.57 ± 0.05**
Left ventricular ejection fraction (%; mean ± SD) ^a	58 ± 4	37 ± 7**	62 ± 3	37 ± 5**
Abnormal electrocardiogram [n (%)]	4 (40)	5 (55)	3 (37)	12 (100)**
Daily ethanol intake (g; mean ± SD)	143 ± 36	189 ± 51 [†]	12 ± 4	13 ± 4
Period of ethanol intake (y; mean ± SD)	23.0 ± 2.4	24.0 ± 6.7	5.9 ± 6	6.4 ± 5
Lifetime dose of ethanol (kg ethanol/kg body weight; mean ± SD)	19.0 ± 3.7	23.3 ± 3.9 [†]	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2
TUNEL (% of myocardial cells; mean ± SD)	1.8 ± 1.9	5.9 ± 3.8*	1.1 ± 0.8	5.6 ± 2.6**
BAX (% of myocardial cells; mean ± SD)	6.4 ± 4.9	19.9 ± 16.9 [†]	6.1 ± 7.9	19.6 ± 15.3 [†]
BCL-2 (% of myocardial cells; mean ± SD)	3.7 ± 2.9	16.7 ± 14.2*	3.0 ± 3.3	16.3 ± 13.1*
BCL-2/BAX ratio (mean ± SD)	0.92 ± 0.67	0.74 ± 0.50	0.74 ± 0.50	0.87 ± 0.38

Abbreviation: CMP, cardiomyopathy.

^a Obtained in 28 subjects.

* $P \leq .01$ compared with patients without cardiomyopathy for each group.

** $P < .001$ compared with patients without cardiomyopathy for each group.

[†] $P = .03$ compared with alcoholic patients without cardiomyopathy.

with the other groups ($P < .05$ for all). Leukocyte, lymphocyte, and platelet counts, as well as hemoglobin concentrations and serum muscle enzymes, were similar in all groups. Abdominal ultrasonography was normal in all control subjects and in 18 of the 20 hypertensive subjects, with the remaining subjects showing signs of fatty liver. By contrast, 13 of the 20 alcoholic patients (65%) showed diffuse disruption of the echographic liver structure (Table 1). A liver biopsy was performed on all patients who had an abnormal ultrasonography, and the histologic analysis disclosed 11 cases of fatty liver, 3 of alcoholic hepatitis, and 2 of liver cirrhosis (Child-Pugh class A).

3.3. Cardiac evaluation

According to the criteria described in the "Methods" section, 9 long-term alcoholic patients (47%) and 12 individuals with essential hypertension (60%) had an enlarged heart (cardiothoracic index, ≥ 0.48). Table 3 discloses the cardiac functional data of the subgroups of patients according to the presence or absence of a dilated heart. All alcoholic patients and hypertensive patients in NYHA classes II to IV had enlarged hearts. No difference in nutritional data was observed among the subgroups of patients. In concordance with previous studies, alcoholic patients with dilated hearts had a significantly greater daily and lifetime ethanol intake as compared with those without heart enlargement.

3.4. Myocardial histologic analysis

Histologic evaluation of myocardial samples from control subjects had normal results except for slight signs of myocyte hypertrophy and interstitial fibrosis in 2 specimens (Table 4). Most patients with enlarged hearts had myocyte and/or nuclear hypertrophy, and more than two thirds showed interstitial fibrosis. By contrast, patients with a normal cardiac size exhibited myocyte abnormalities in

only approximately one third of the cases. No difference was observed in the analysis of the histologic parameters with respect to the origin of cardiomyopathy. The structural damage to the heart muscle adopted the pattern of secondary myocytolysis of toxic origin rather than the colliquative myocytolysis pattern as described elsewhere [23]. Thus, myocytolysis should truly be considered as apoptosis.

3.5. Apoptosis studies

In the evaluation of the presence of apoptosis in cardiac myocytes (Fig. 1), we observed that the AI did not differ among the groups ($2.7\% \pm 1.5\%$, $3.8\% \pm 3.5\%$, and $4.0\% \pm 3.0\%$, for control subjects, alcoholic patients, and hypertensive patients, respectively; $P =$ nonsignificant; Table 2). The BAX and BCL-2 AIs (Figs. 2 and 3) were significantly higher in long-term alcoholic patients and hypertensive patients than in control donors ($P = .04$ for all). Subjects with structural heart damage of either alcoholic or hypertensive origin showed higher AIs in the TUNEL, BAX, and BCL-2 myocyte assays as compared with the control subjects ($P < .001$ for all). For long-term alcoholic patients and hypertensive patients, subgroups of donors with cardiomyopathy exhibited significantly greater AIs by all 3 measures as compared with donors without cardiomyopathy ($P < .03$ for all; Table 3). However, the BCL-2/BAX ratio, an index of global apoptotic activation, was similar in all subgroups of alcoholic patients and hypertensive patients.

When comparing NYHA functional class I alcoholic patients with control subjects and with NYHA functional class I hypertensive patients, no difference was detected in the TUNEL AI. However, alcoholic donors showed a significantly higher expression in the BAX and BCL-2 assays as compared with the control subjects (12.1 ± 10.7 versus 3.8 ± 4.4 for BAX assay and 9.0 ± 8.9 versus 2.7 ± 2.0 for BCL-2 assay; $P < .05$ for both), suggesting a different proapoptotic activation status in alcoholic patients.

Table 4 Myocardial histologic analysis

	Control subjects (n = 7)	Alcoholic patients without CMP (n = 10)	Alcoholic patients with CMP (n = 9)	Hypertensive patients without CMP (n = 8)	Hypertensive patients with CMP (n = 12)
Myocyte hypertrophy	1 (14)	3 (30)	7 (73)*	2 (25)	9 (75)*
Myocyte nuclear hypertrophy	2 (28)	4 (40)	7 (73)	3 (37)	11 (92)***
Myocyte necrosis	1 (14)	2 (20)	2 (22)	2 (25)	2 (17)
Interstitial fibrosis	1 (14)	2 (20)	6 (66)	4 (50)	9 (75)
Degree of histologic lesions					
Normal	6 (86)	7 (70)	1 (11)*	6 (75)	1 (8)**
Mild	1 (14)	2 (20)	4 (44)	2 (25)	7 (58)
Moderate	0	1 (10)	2 (22)	0	3 (25)
Severe	0	0	2 (22)	0	1 (8)

NOTE. Data are expressed as n (%).

* $P = .06$ compared with patients in group without cardiomyopathy.

** $P = .02$ compared with patients in group without cardiomyopathy.

*** $P = .01$ compared with patients in group without cardiomyopathy.

No difference was detected between alcoholic patients and hypertensive patients and between hypertensive patients and control subjects in any of the 3 assays.

Considering all donors, we observed a relation between the TUNEL assay results and the cardiothoracic index ($r = 0.45$; $P < .001$). In addition, all 3 AIs paralleled the degree of histologic myocardial damage (Table 5). No relation was observed between the different AIs and the parameters of nutritional status and alcohol consumption (daily dose of alcohol, duration of alcoholism, or total lifetime dose of alcohol).

4. Discussion

In the present study, we found an increase in myocardial apoptosis measured by detection of DNA fragmentation with the TUNEL assay and activation of apoptosis-regulating mechanisms (BAX and BCL-2) in organ donors with cardiomyopathy of either alcoholic or hypertensive origin. In alcoholic patients, apoptosis evaluated with the TUNEL assay did not depend on a donor's ethanol consumption but did on the presence of heart damage. However, we also observed data suggesting a specific role of alcohol consumption in activating BAX and BCL-2 proapoptosis-regulating mechanisms.

Apoptosis is a complex, tightly regulated, and evolutionarily conserved mode of cell death that has been implicated in a variety of cardiac diseases [10,24]. For example, apoptosis may be responsible for the progressive intrinsic contractile dysfunction and myocyte loss in dilated cardiomyopathies of either ischemic or idiopathic origin [11,25]. Myocyte growth and hypertrophy have been found to be not only adaptive processes but also key points in apoptotic activation [26].

The pathogenesis of alcohol-related tissue damage is clearly multifactorial [27], yet apoptosis has been implicated as a mechanism in a wide range of alcohol-induced pathologic conditions involving several human tissues. In experimental studies, Jänkälä et al [28] described the induction of myocardial apoptosis in rats through combined calcium carbimide and ethanol treatment. We recently reported on the presence of apoptosis in the skeletal muscle of high-dose alcohol consumers, mainly in those with structural myopathy [29]. Because skeletal and cardiac myocytes are related in their clinical, functional, and pathogenic mechanisms of disease [13], it has been hypothesized that apoptosis might be involved in the pathogenesis of alcohol-induced heart disease. However, myocardial tissue damage itself may induce apoptosis [30,31]. The present study was designed to evaluate the influence of the various factors potentially involved in the development of apoptotic-dependent heart muscle damage in long-term alcohol consumers. Thus, we compared a group of long-term high-dose alcohol consumers with another group of nonalcoholic heart donors with long-

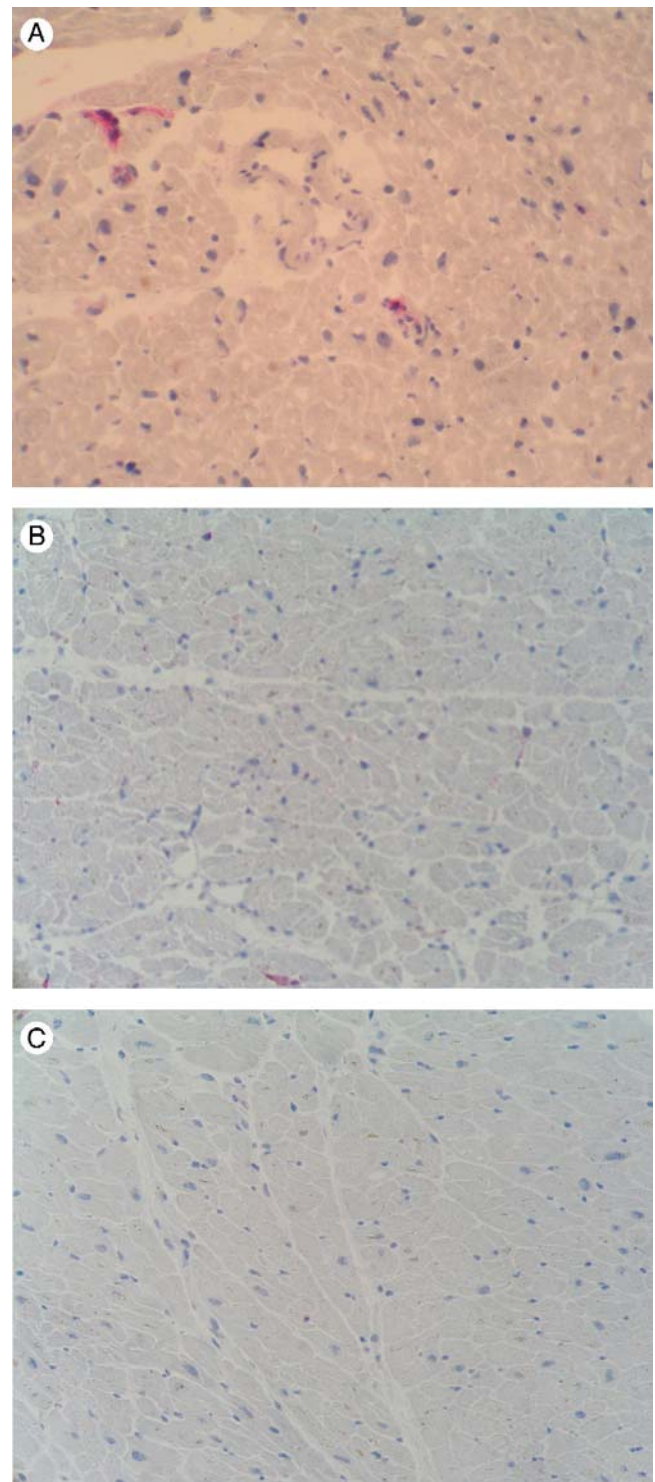


Fig. 1 The TUNEL immunohistochemical assay in left ventricle muscle biopsy specimens of heart donors. A, High-dose alcohol consumer with dilated cardiomyopathy. Several myocytes show intense nuclear and perinuclear staining. B, Hypertensive subject with dilated cardiomyopathy. Several myocytes show nuclear staining. C, Healthy donor with absence of TUNEL reactivity.

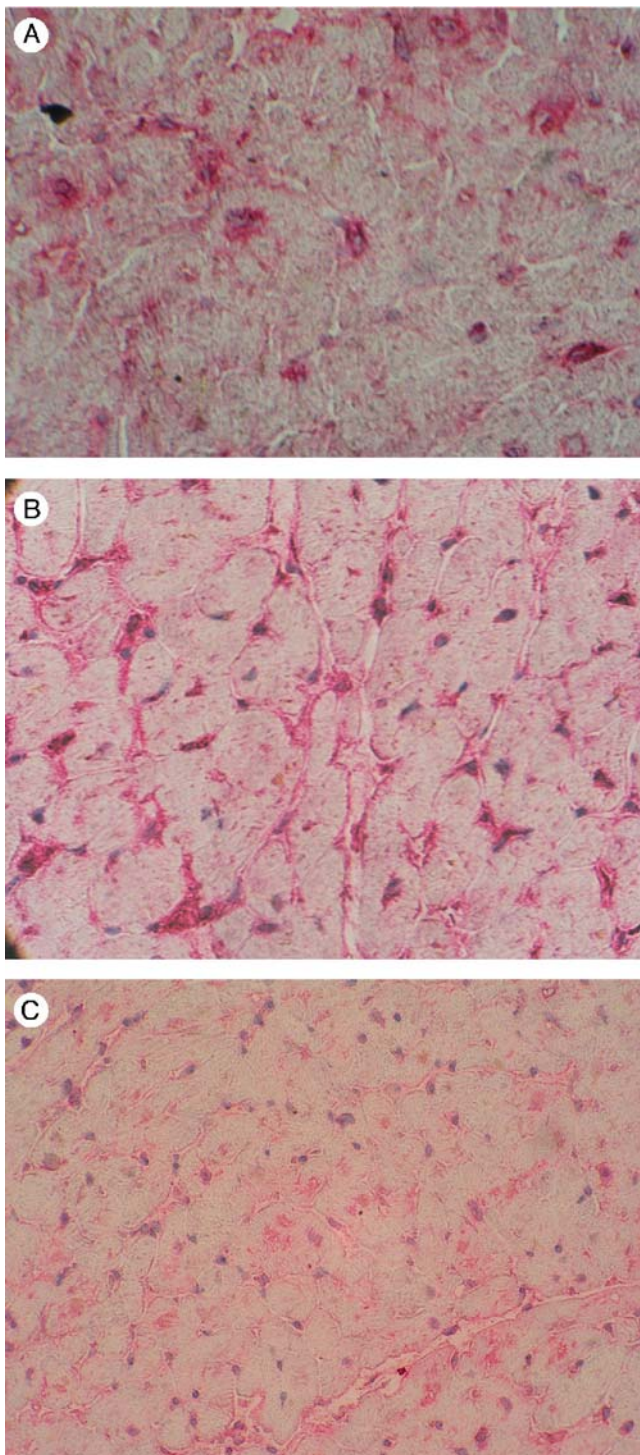


Fig. 2 The BAX immunohistochemical assay in left ventricle muscle biopsy specimens of heart donors. A, High-dose alcohol consumer with dilated cardiomyopathy. Some nuclei stained intensely. B, Hypertensive subject with dilated cardiomyopathy. Perinuclear and subsarcolemmal staining is present in most of the myocytes. C, Healthy donor with negative myocyte staining. Only slight interstitial reactivity is present.

standing hypertension and a control group of nonalcoholic subjects without cardiomyopathy because both alcohol and hypertension are known causes of structural damage leading to dilated cardiomyopathy [4,32] and have been related to potential activation of apoptosis [3,33-35]. This approach allowed us to evaluate the effect of ethanol itself on apoptosis and differentiate it from other causes of structural heart muscle damage.

In the present study, overall activation of apoptosis (evaluated with the TUNEL assay) and that of apoptosis-regulating mechanisms (evaluated with the BAX and BCL-2 assays) were similar in the group of subjects with long-term alcohol consumption and in that of subjects with a history of hypertension and were found to be related to the presence and degree of structural cardiac damage. The BAX and BCL-2 indexes were also significantly higher in long-term alcohol consumers and hypertensive subjects than in control donors. For long-term alcoholic patients and hypertensive patients, the subgroups of donors with cardiomyopathy exhibited a significantly greater presence of all 3 AIs (TUNEL, BAX, and BCL-2) as compared with those without cardiomyopathy. All 3 AIs paralleled the degree of heart enlargement evaluated with radiologic studies and by quantification of the degree of histologic myocardial damage. By contrast, no correlation was observed between the different AIs and the parameters of nutritional status and alcohol consumption. The similar BCL-2/BAX ratios observed in alcoholic patients and hypertensive patients with or without cardiomyopathy suggest a similar activation of proapoptotic (BAX) and antiapoptotic (BCL-2) mechanisms, as previously observed in alcoholic skeletal myopathy [29]. However, the subgroup of alcoholic patients without heart failure (NYHA class I) showed significantly higher BAX and BCL expressions as compared with control subjects, suggesting a specific role of alcohol in the activation of proapoptosis-regulating mechanisms.

The relatively high percentage of muscle apoptosis detected in alcoholic patients in the present study with the TUNEL assay is concordant with that observed in experimental [28] and clinical [29] studies. However, some degree of overdetection may be present because the TUNEL assay may detect some reversible DNA fragmentation [19-22]. In fact, a sustained high number of myocytes in apoptosis is not compatible with myocardial viability, and it is plausible that some mechanisms of slow apoptosis may be involved [3,36]. In vitro experiments suggest that apoptosis is a short-term process that develops in a mean of 2 hours. In vivo, this process may develop in 4 hours. However, this fact is not congruent with what occurs in clinical models of dilated cardiomyopathy. If the number of cells detected with apoptotic assays entered apoptosis in 4 hours, as occurs in in vivo models, then half of the ventricular mass would disappear in 40 days [37]. This prediction is not in accord with the clinical evidence in which loss of ventricular mass is clearly slower. This moves us to consider the possibility of apoptosis as a slower process, regulated as a nonterminal

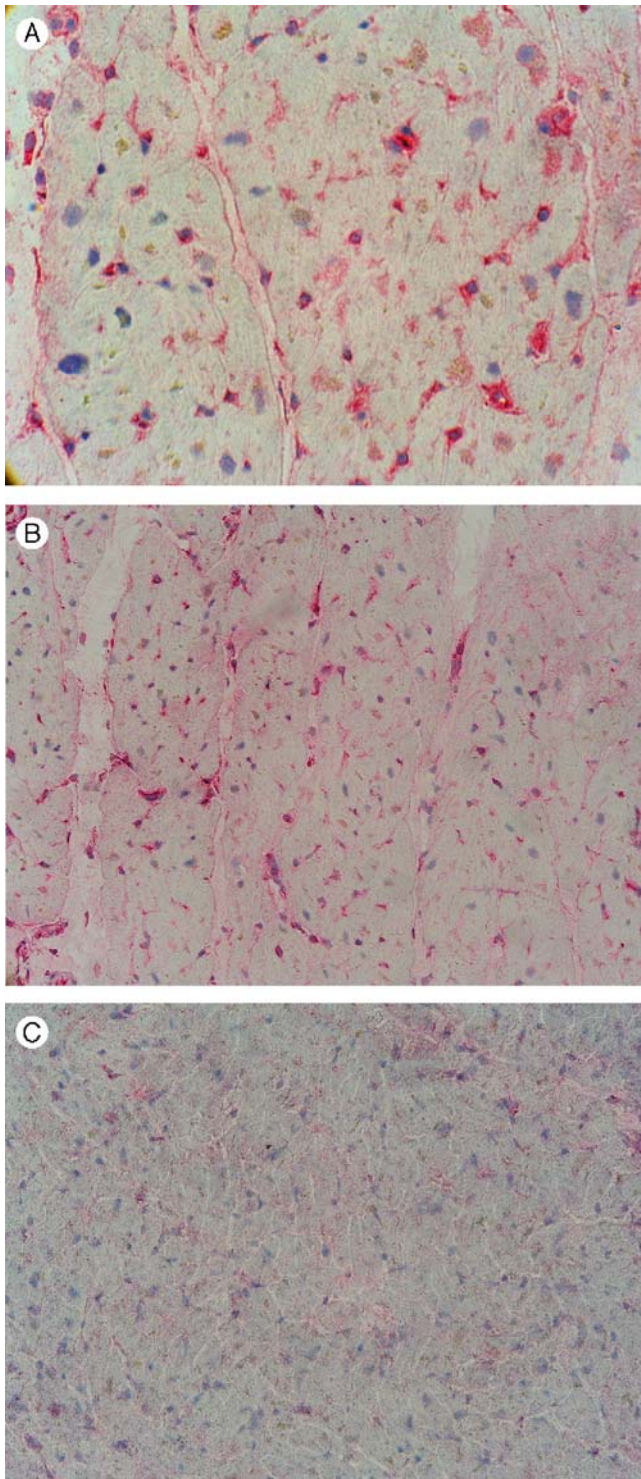


Fig. 3 The BCL-2 immunohistochemical assay in left ventricle muscle biopsy specimens of heart donors. A, High-dose alcohol consumer with dilated cardiomyopathy. Intense perinuclear and cytoplasmic staining is present. B, Hypertensive subject with dilated cardiomyopathy. Staining is present in perinuclear and subsarcolemmal areas of most myocytes. C, Healthy donor with negative BCL-2 staining. Only slight interstitial reactivity is present.

Table 5 Myocardial immunohistochemical studies on apoptosis according to presence and grade of histologic damage

	Absent (n = 21)	Mild (n = 16)	Moderate to severe (n = 9)
TUNEL (% of myocardial cells)	1.6 ± 1.5	4.9 ± 2.8**	8.1 ± 3.3** [†]
BAX (% of myocardial cells)	5.7 ± 5.7	12.9 ± 11.4*	29.1 ± 17.7** ^{††}
BCL-2 (% of myocardial cells)	3.6 ± 3.0	11.0 ± 9.8*	23.7 ± 5.0** ^{††}

NOTE. Data are expressed as mean ± SD.

* $P = .01$ compared with absent histologic damage.

** $P < .001$ compared with absent histologic damage.

[†] $P = .02$ compared with mild histologic damage.

^{††} $P = .01$ compared with mild histologic damage.

event, with potential reversibility through inhibitory factors such as BCL-2 [35].

This is the first study reporting evidence of increased apoptosis and activation of apoptosis-regulating mechanisms in long-term alcohol consumers with dilated cardiomyopathy. The absence of a significant correlation between the TUNEL AI and the parameters of ethanol consumption may be caused by limitations of sample size and the homogeneous quantity of alcohol consumed by this group, although alcoholic patients without heart failure showed significantly increased proapoptotic BAX and BCL-2 regulating mechanisms. Other factors directly related to ethanol consumption, such as caspase, cytokine, or insulin-like growth factor activation, may influence BCL-2 and BAX expressions [38-40]. In our experience, there is an inverse correlation between lifetime alcohol consumption and measures of left ventricular function [1,13]. However, the presence and intensity of myocardial histologic damage may relate not only to alcohol consumption but also to other factors such as individual genetic susceptibility to alcohol-induced heart damage, as we demonstrated in the case of the angiotensin-converting enzyme DD genotype [41]. Of note, the results of the present study do not apply to low-dose ethanol consumption or to immediate effects of alcohol on the heart and do not allow apoptosis to be designated as the only pathogenic mechanism leading to myocardial damage in alcoholism or hypertension, otherwise regarded as multifactorial situations [27,34].

The results of this study are in agreement with those obtained by our group in the skeletal muscle, where proapoptotic (BAX and BCL-2) mechanisms were activated and apoptosis mainly affected high-dose alcohol consumers with structural myopathy [29]. In fact, the local balance of proapoptotic (ie, BAX) and antiapoptotic (ie, BCL-2) stimuli decides the survival or death of each individual cell [42]. In previous studies, a decreased BCL-2/BAX ratio increased the probability of myocardial cell apoptosis [43]. Myocyte apoptosis seems to be a common pathogenic mechanism involved in the development of heart muscle damage in a

variety of conditions, such as end-stage heart failure [16], dilated cardiomyopathies [25], and unhealthy cardiac overload and hypertrophy [34,35]. Because the processes of apoptosis and cell necrosis have common pathogenic mechanisms, this may explain the fact that the various causes of heart damage may activate these interrelated pathways [11,44]. Alcohol consumption is commonly involved in apoptosis-regulating mechanisms and induces myocardial apoptosis, as do other pathogenic agents (hypertension, ischemia, cardiac overload) [11,34,45].

In summary, we observed a significantly increased apoptotic nuclear index (TUNEL) and altered apoptosis-regulating mechanisms (BAX and BCL-2 pathways) in the heart muscle of donors with long-term high-dose alcohol consumption, which were related to the degree of cardiac damage. The degree of cardiac apoptosis in long-term high-dose alcohol consumers was similar to that found in hypertensive patients with comparable structural heart damage. Further studies are needed to determine specific mechanisms and factors influencing the triggering and development of cardiomyocyte apoptosis [44,46,47].

References

- [1] Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont L, Rubin E. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 1989;320:409-11.
- [2] Moushmouth B, Ali-Mansour P. Alcohol and the heart: the long-term effects of alcohol on the cardiovascular system. *Arch Intern Med* 1991;151:36-42.
- [3] Urbano-Márquez A, Fernández-Solà J. The effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. *Muscle Nerve* 2004;30:689-707.
- [4] Piano M. Alcoholic cardiomyopathy: incidence, clinical characteristics and pathophysiology. *Chest* 2002;121:1638-50.
- [5] Fernández-Solà J, Nicolás JM, Fatjó F, Paré JC, Sacanella E, Estruch A. Diastolic impairment in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1830-5.
- [6] Nicolás JM, Fernández-Solà J, Estruch R, Paré JC, Urbano-Márquez A, Rubin E. The effect of controlled drinking in alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 2002;136:192-200.
- [7] Danziger RS, Sakai M, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Hansford EG, Lakata EG. Ethanol acutely and reversibly suppresses excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 1991;68:1660-8.
- [8] Preedy VR, Patel VB, Why HJF, Corbett JM, Dunn MJ, Richardson PJ. Alcohol and heart: biochemical alterations. *Cardiovasc Res* 1996;31:139-47.
- [9] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circulation* 1998;82:1111-29.
- [10] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999;29:292.
- [11] Regula KM, Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes; a means to an end. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:3-13.
- [12] Sobel LC, Maisto SA, Sobell MB, Cooper AM. Reliability of alcohol abusers' self-reports of drinking behaviour. *Behav Res Ther* 1979;17:157-60.
- [13] Fernández-Solà J, Estruch R, Grau JM, Paré JC, Urbano-Márquez A, Rubin E. The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1994;120:529-36.
- [14] 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.
- [15] Gottdiener JS, Berdnarz J, Devereux R, et al. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:1086-119.
- [16] Narula J, Haider N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335:1182-9.
- [17] Paul M. Apoptosis in cardiac disease: from basics to clinics—an editorial commentary. Symposium: Programmed Cell Death—Clinical Reality and Therapeutic Strategies. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:553-4.
- [18] Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolow M, et al. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 1995;373:291-5.
- [19] 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.
- [20] Koda M, Takemura G, Kanoh M, et al. 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.
- [21] Kanoh M, Takemura G, Misao J, et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999;99:2757-64.
- [22] Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 1999;24:189-95.
- [23] Turillazi E, Baroldi G, Silver MD, Parolini M, Pomara C, Fineschi V. A systematic study of a myocardial lesion: colliquative myocytolysis. *Int J Cardiol* 2005;104:152-7.
- [24] Neuss M, Crow MT, Chelsey A, Lakatta EG. Apoptosis in cardiac disease: what is it—how does it occur? *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:509-25.
- [25] Sabahh HN, Sharov VG. Apoptosis in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;40:549-62.
- [26] Van Empel VPM, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res* 2004;63:487-99.
- [27] Molina P, McClain C, Valla D, et al. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Dis* 2002;26:120-8.
- [28] Jänkälä H, Eriksson P, Eklund KE, Härkönen M, Mäkin T. Combined calcium carbimide and ethanol treatment induces high blood acetaldehyde levels, myocardial apoptosis and altered expression of apoptosis-regulating genes in rat. *Alcohol Alcohol* 2002;37:222-8.
- [29] Fernández-Solà J, Nicolás JM, Fatjó F, et al. Evidence of apoptosis in chronic alcoholic skeletal myopathy. *HUM PATHOL* 2003;34:1247-52.
- [30] Anversa P, Nadal-Guinard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 2002;415:240-3.
- [31] Yussman MG, Toyokawa T, Odley A, et al. Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat Med* 2002;8:725-30.
- [32] de Carvalho Frim C, Soufen HN, Koihe MK, Pereira V. The long-term outcome of patients with hypertensive cardiomyopathy. *J Hum Hypertens* 2005;19:393-400.
- [33] Hajnocz YG, Buzas CJ, Pacher P, Hoeck JB, Rubin E. Alcohol and mitochondria in cardiac apoptosis: mechanisms and visualization. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:693-701.
- [34] Gonzalez A, Fortuno MA, Querejeta R, et al. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003;59:549-62.
- [35] Nadal-Guinard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Myocyte deaths, growth and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003;92:139-50.

- [36] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. *J Cardiac Fail* 2002;8:S518-25.
- [37] Anversa P, Sussman M, Bolli R. Molecular genetic advances in cardiovascular medicine. *Circulation* 2004;109:2832-8.
- [38] Dong Q, Xiao Y, Joshi-Barnes S, McClain CJ, Barve SS. Ethanol enhances activation-induced caspase-3 dependent cell death in T lymphocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:363-70.
- [39] Aroor AR, Shukla SD. MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Sci* 2004;74:2339-64.
- [40] Chen DB, Wang L, Wang PH. Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci* 2000;67:1683-93.
- [41] Fernández-Solà J, Nicolas JM, Oriola J, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with vulnerability to alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 2002;137:321-6.
- [42] Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;279:511-32.
- [43] Condorelli G, Morisco C, Stassi G, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left-ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 1999;3071-8.
- [44] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol* 2003;23:447-59.
- [45] Berneker OY, Huq F, Heist EK, Podesser BK, Hajjar RJ. Apoptosis in heart failure and the senescent heart. *Cardiovasc Toxicol* 2003;3:183-90.
- [46] Feuerstein GZ. Apoptosis: new opportunities for novel therapeutics for heart diseases. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:547-51.
- [47] Webster K, Bishopric N. Apoptosis inhibitors for heart disease. *Circulation* 2003;108:2954.

RESUM DE L'ARTICLE: "Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy."

En el present estudi s'ha estudiat la presència d'apoptosi en el teixit miocàrdic en relació al consum crònic patològic d'alcohol i la possible relació amb el desenvolupament de miocardiopatia alcohòlica.

L'apoptosi s'ha avaluat usant la tècnica TUNEL i mesurant l'expressió de BAX (com inductor d'apoptosi) i BCL-2 (com a protector per a apoptosi) en mostres de miocardi humà (no aptes per a trasplantament) de donants. El grup d'estudi han estat: 7 controls, 19 pacients amb consum crònic patològic d'alcohol i 20 pacients amb hipertensió crònica.

El grup amb consum crònic excessiu d'alcohol i el grup d'hipertensos mostren índex apoptòtics similars. Però quan ens centrem en els pacient amb miocardiopatia, indistintament si és d'origen alcohòlic o hipertensiu, es pot observar que presenten índex d'apoptosi (TUNEL, BAX i BCL-2) superiors als controls ($p < 0.001$, tots). Un subgrup d'alcohòlics amb NYHA classe-1 mostra una expressió significativament superior respecte controls de BAX i BCL-2, suggerint un rol específic de l'alcohol en l'activació dels mecanismes d'apoptosi ($p < 0.05$, ambdós).

Concloem, doncs, que l'apoptosi es present tan en el grup amb consum crònic excessiu d'alcohol com en el grup d'hipertensos en un grau similar i que el grau d'apoptosi està en relació amb el grau de lesió estructural.

**ESTAT OXIDATIU DEL MIOCARDI EN EL
CONSUM CRÒNIC D'ALCOHOL.**

**MYOCARDIAL ANTIOXIDANT STATUS IN
CHRONIC ALCOHOLISM.**

Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badía E, Sacanella E,
Estruch R, Nicolás JM.

Alcohol Clin Exp Res. 2005;29(5):864-870.

Myocardial Antioxidant Status in Chronic Alcoholism

Francesc Fatjó, Joaquim Fernández-Solà, Meritxell Lluís, Montserrat Elena, Eva Badía, Emilio Sacanella, Ramón Estruch, and Josep-María Nicolás

Background: Excessive ethanol intake is one of the most frequent causes of acquired dilated cardiomyopathy in developed countries. The pathogenesis is multifactorial, with the antioxidant imbalance of cardiac muscle being a potential factor. The current study evaluates myocardial antioxidant status in ethanol consumers and its relation to cardiac damage.

Methods: The authors assessed superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase enzyme activities as well as the total antioxidant status capacity in myocardial samples obtained from organ donors with sudden death of traumatic or neurological origin. They studied 23 high-dose chronic alcohol consumers, 27 individuals with long-standing hypertension, and 11 healthy controls. Cardiomyopathy was defined according to standard functional and histological criteria.

Results: Patients with dilated cardiomyopathy, either of alcoholic or hypertensive origin, showed increased myocardial superoxide dismutase activities compared with patients without cardiomyopathy ($p < 0.001$, both) and controls ($p < 0.05$, both). Total antioxidant status capacity and the activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymes were similar in all groups. Superoxide dismutase activity was related to the presence of cardiac enlargement and the degree of cardiac histological damage. The amount and type of alcoholic beverages as well as the nutritional status of the patients were not related to myocardial antioxidant activity.

Conclusions: The presence of dilated cardiomyopathy, of either alcoholic or hypertensive origin, is related to an increase in myocardial superoxide dismutase activity.

Key Words: Ethanol, Myocardium, Oxidative damage, Superoxide dismutase, Cardiomyopathy.

CHRONIC ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY is a well-defined entity related to a dose-dependent consumption of ethanol and occurs independently of coexisting nutritional factors or vitamin deficiencies (Fernández-Solà et al., 1997; Moushmouth and Ali-Mansour, 1991; Urbano-Márquez et al., 1989, 1995). It is characterized by the development of structural and functional changes in the myocardium, most of which remain subclinical to later manifest as a low-output dilated cardiomyopathy (Urbano-Márquez et al., 1989). The multifactorial pathogenesis of alcoholic skeletal or cardiac muscle disease has been only partially clarified, and some authors have suggested that a selective disturbance of antioxidants is involved (Bjorneboe and Bjorneboe, 1993; Fernández-Solà et al., 1997; García-Buñuel, 1984; Preedy et al., 1999). In fact, antioxidant

imbalance has been observed in chronic alcoholism, with evidence of increased skeletal muscle lipid peroxidation and free radical production (Adachi et al., 2000; Preedy et al., 2001). Although oxidant muscle damage by ethanol occurs in experimental models (Ansell et al., 1994; Kannan et al., 2004; Preedy et al., 1999), this issue remains to be confirmed in the clinical setting. In this sense, a number of authors have reported a decrease in plasma antioxidant vitamins in alcoholics (Bjorneboe et al., 1988; Ward and Peters, 1992). However, in a previous study (Fernández-Solà et al., 1998), we observed that serum and muscle antioxidant vitamins (α -tocopherol, ascorbic acid, and retinol) were normal in well-nourished alcoholics, either with or without skeletal myopathy. Moreover, antioxidant vitamin replacement has not been shown to be effective in improving cardiovascular disease (Omenn et al., 1996). Regarding nonvitamin antioxidants in chronic alcoholism, we observed a 16% reduction in glutathione peroxidase and a 13% increase in superoxide dismutase in skeletal muscle (Fernández-Solà et al., 2002), although these changes were not related to the presence of myopathy, the amount of ethanol consumed, or the nutritional status of the patients.

The myocardium, like other tissues, has metabolic systems that neutralize free radicals (Cederbaum, 2001; McDonough, 1999; Sun et al., 2001). The enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase as well as nonenzyme vitamin E and ascorbic

From the Department of Internal Medicine (FF, JF-S, ML, EB, ES, RE, J-MN) and Biochemistry Laboratory (ME), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received for publication October 26, 2004; accepted January 20, 2005.

Supported by research grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (98/0330, 02/0533, and 02/0535), Instituto de Salud Carlos III (G03/140), and Generalitat de Catalunya (2001/SGR-279).

Reprint requests: Josep-María Nicolás, MD, Department of Internal Medicine, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; Fax: 34-93-227-55-39; E-mail: nicolas@clinic.ub.es

Copyright © 2005 by the Research Society on Alcoholism.

DOI: 10.1097/01.ALC.0000163501.91539.1F

acid are the main tissue antioxidants. They are responsible for removing superoxide radicals, hydrogen peroxide, and organic hyperoxides (Powers and Lennon, 1999), which are involved in cardiac damage. Some studies have reported disturbances of antioxidant myocardial systems in patients with dilated cardiomyopathy or heart failure (Mallat et al., 1998; Yucel et al., 1998). Moreover, the production of reactive oxygen species has been considered in the development of cardiomyopathy in alcoholics (Beckemeier and Bora, 1998; McDonough, 1999; Preedy et al., 1999). Finally, it has been hypothesized that myocardial damage itself, independently of the cause, may induce overexpression of myocardial antioxidant factors (Mak and Newton, 2001).

Based on the previous findings of antioxidant muscle disturbances in chronic alcoholism and because no study has evaluated nonvitamin antioxidant status in human myocardium, we embarked on a study to measure superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase enzyme activity, and total antioxidant status capacity in cardiac muscle specimens from chronic alcoholics. We evaluated their relation with ethanol consumption, nutritional status, and presence or absence of cardiomyopathy.

MATERIALS AND METHODS

Patient and Control Selection

During a 3-year period, we consecutively studied hearts from people with brain death either of traumatic or cerebrovascular origin and who had been considered suitable as organ donors by the transplant team of the Hospital Clínic of Barcelona. From 127 cadaveric donors younger than 70 years, 71 hearts were not suitable for transplantation. Of these, we selected 27 from patients with chronic hypertension, 23 because of a history of ethanol intake (≥ 60 g/day for at least the previous 5 years), and 11 hearts from healthy people that were not finally eligible for being implanted because of a lack of a matched receptor or size inadequacy. Additionally, 7 specimens from patients with heart disease (5 with coronary disease and 2 with heart valve disease) and 3 from people with concomitant hypertension and alcoholism were not included to maintain homogeneity in the study groups.

In all cases, the patients had been admitted to the intensive care unit, and ventilatory and hemodynamic parameters were properly maintained throughout their stay: arterial oxygen tension greater than 60 mmHg, systolic blood pressure greater than 100 mmHg, and arterial pH within the reference range. None of the patients required cardiopulmonary in-hospital resuscitation maneuvers. All patients were white people of Spanish descent who lived with their families in or around Barcelona, and none was indigent. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona, and informed consent was obtained from the families of the donors for the use of myocardial tissue for research purposes.

Clinical Evaluation

A detailed history of ethanol intake was obtained retrospectively by consultation with family members using a structured questionnaire (time-line follow-back method; Sobell et al., 1979) as previously reported (Fernández-Solà et al., 1994; Urbano-Márquez et al., 1989, 1995). Duration of ethanol intake was calculated as the total cumulated period of alcohol consumption (in years). Body mass index was determined as the actual body weight relative to the square of the body height (BMI, in kg/m^2). Patients were considered to have caloric malnutrition if their BMI was less than $17 \text{ kg}/\text{m}^2$. Protein malnutrition was assessed with use of the

following parameters obtained at hospital admission: hemoglobin, lymphocyte count, total protein, and albumin. As part of routine assessment for liver donation, abdominal ultrasonography was performed in all patients. Moreover, an open liver biopsy was obtained from donors whose liver was not suitable for donation.

Cardiac Studies

Past and current signs and symptoms of heart failure were evaluated in consultation with medical records and family members of the donors, and the New York Heart Association (NYHA) functional class was determined according to the Goldman activity scale (Goldman et al., 1981). Chest x-ray with measurement of the cardiothoracic index and conventional electrocardiography were performed in all cases. Moreover, bidimensional echocardiography was performed (Hewlett-Packard Sonos 2.500 instrument, Andover, MA) in 22 patients with a cardiothoracic index of 0.48 or greater and 14 patients without cardiac enlargement. End-diastolic and end-systolic diameters, the shortening fraction, left ventricular mass, and ejection fraction were measured according to the standards of the American Society of Echocardiography (Vanderberg and Skorton, 1989). We observed a good correlation between cardiothoracic index and left ventricular end-diastolic diameter ($r = 0.68, p < 0.01$). The personnel who performed and evaluated these tests had no knowledge of the alcoholic history of the patients.

Myocardium Histological Studies

At the time the donor was under cold perfusion, the distal 3 cm of the left ventricular apex was surgically excised (total weight of 4–5 g). The specimen was cut into fragments, and one of these was processed for further histological analysis. The remaining fragments were immediately frozen under liquid nitrogen until biochemical studies were performed. For histological studies, specimens were stained with hematoxylin–eosin and toluidine blue in semithin sections. We evaluated the degree of myocardial cell and nuclear hypertrophy, myocytolysis (defined as the presence of myofiber disarray, or cell vacuolization), and interstitial fibrosis by two independent observers. The amounts of interstitial fibrosis (volume fraction of fibrosis) and cardiac muscle cells (volume fraction of the myocytes) were assessed as previously reported (Fernández-Solà et al., 1994). The degree of global histology involvement was graded as normal, mild, moderate, or severe according to previously defined criteria (Fernández-Solà et al., 1994).

Oxidative Myocardium Status Evaluation

A 100- to 200-mg frozen-fragment of the stored myocardium was processed for biochemical studies. It was thawed and washed with cold isotonic saline containing 1 nM EDTA to remove the erythrocytes. Myocardial tissue was minced in a cold buffer containing 50 nM potassium phosphate and 1 mM EDTA at a pH of 7.5 and homogenized. The homogenate was centrifuged at an average force of $8500 \times g$ at 4°C for 10 min. The pellet was discharged, and the supernatant was used for biochemical studies. Protein content in the supernatant was measured according to the method of Bradford (1976). All measurements were performed with colorimetric assays using a spectrophotometer (Cobas Mira, Roche, Basel, Switzerland). All enzyme activity units were referred in relation to the quantity (grams) of muscle tissue analyzed. Interassay and intraassay variability rates were lower than 5%.

Antioxidant activity was measured with biochemical reagents obtained from Bioxytech assay (Oxis International Inc., Portland, OR). Superoxide dismutase activity was measured with the superoxide dismutase-525 method according to Beyer et al. (1991). In brief, this method takes advantage of a proprietary reagent whose alkaline oxidation is accelerated by any catalyst endowed with superoxide dismutase activity. This autooxidation yields a chromophore that absorbs light at 525 nm. In addition, a second reagent is used, allowing the elimination of major interferences due to the presence of mercaptan compounds in the sample. The pH at which the kinetic measurement was fixed at 8.8, which results in optimal

Table 1. Epidemiological and Clinical Data of Chronic Alcoholics, Hypertensive Individuals, and Controls

	Controls (n = 11)	Alcoholics (n = 23)	Hypertensives (n = 27)
Age (yr)	57.1 ± 13.2	52.6 ± 10.3	60.5 ± 16.4
Sex (male/female)	4/7	19/4*	16/9
Causes of death			
Cranial trauma (n, %)	6 (54)	16 (69)	3 (11)**
Cerebrovascular disease (n, %)	5 (45)	5 (22)	22 (81)
Other causes (n, %)	0	2 (9)	2 (7)
Time from admission to donation (hr)	30 ± 2	32 ± 3	29 ± 3
Active smokers (n, %)	2 (18)	21 (91)***	5 (19)
Daily alcohol intake (g)	10 ± 2	165 ± 43***	13 ± 5
Duration of ethanol intake (yr)	5.5 ± 1.4	25.1 ± 5.4***	6.2 ± 2.1
Lifetime dose of ethanol (kg ethanol/kg body weight)	0.3 ± 0.1	21.3 ± 5.6***	0.4 ± 0.2
NYHA function (n, %)			
Class I	11 (100)	17 (74)	18 (67)
Class II	0	5 (22)	7 (26)
Class III or IV	0	1 (4)	2 (7)
Cardiothoracic index	0.48 ± 0.01	0.54 ± 0.06**	0.54 ± 0.04**
Left ventricle ejection fraction (%) ^a	61 ± 3	46 ± 9**	45 ± 10**
Electrocardiogram (abnormal cases, %) ^b	1 (9)	11 (48)	20 (74)
Liver echosonogram (abnormal cases, %)	1 (9)	16 (70)	3 (11)

Data are expressed as mean ± SD.

^a Left ventricle ejection fraction was obtained in 36 subjects.

^b Abnormal electrocardiogram defined in presence of rhythm disturbances, conduction defects, signs of left ventricular hypertrophy, or abnormal repolarization.

* $p = 0.01$, ** $p < 0.01$ compared with controls, *** $p < 0.001$ compared with controls and hypertensive patients.

NYHA, New York Heart Association.

sensitivity of the assay without significant inactivation of the known superoxide dismutase enzymes, such as copper, zinc, manganese, or iron-superoxide dismutase. Glutathione peroxidase activity was measured according to the method reported by Ursini et al. (1995). To assay glutathione peroxidase, the cardiac muscle homogenate was added to a solution containing glutathione, glutathione reductase, and NADPH. Oxidized glutathione (GSSG), produced upon reduction of an organic peroxide by glutathione peroxidase, is recycled to its reduced state by the enzyme glutathione reductase. The resulting oxidation of NADPH to NADP^+ is accompanied by a decrease in absorbance at 340 nm. The enzyme reaction was initiated by adding the substrate, tert-butyl hydroperoxide. Glutathione reductase activity was measured according to the method reported by Calberg and Mannervik (1985). The glutathione reductase-340 assay is based on the oxidation of NADPH to NADP, catalyzed by a limiting concentration of glutathione reductase. In this reaction, the reduction of GSSG was determined indirectly by the measurement of the consumption of NADPH. One glutathione reductase activity unit is defined as the reduction of a micromole of GSSG per minute at a pH of 7.26 and 25°C.

Total antioxidant status activity was measured by means of a Randox Kit (Antrim, United Kingdom). Reagent ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline sulphonate)) is incubated with a peroxidase (metmyoglobin) and hydrogen peroxide, resulting in the production of a radical cation ABTS^+ . This species is blue-green in color and can be detected at 600 nm. Addition of serum inhibits the reaction to a degree that is proportional to the concentration of antioxidant content.

Statistical Analysis

Standard statistical methods with PSS Statistical Analysis System version 10.0 (SPSS, Chicago, IL) were used. Differences between groups were analyzed using ANOVA, Fisher's exact test, and the two-tailed Student's *t* test. Correlation studies were obtained by Pearson's correlation coefficient. Because most of the variables followed a normal distribution, data are expressed as mean ± SD, and a significance level of $p < 0.05$ was used.

Limitations of the Study

Because of the difficulty in obtaining human myocardium samples, the current study is restricted to a relatively small number of middle-aged,

white, chronic alcoholics, nonalcoholic patients with essential hypertension, and controls. Because of the design of this study, only a retrospective approach for the drinking habits of all donors by the family members was possible. Global caloric and protein nutritional status of the patients was assessed, and the dietary and beverage contents of antioxidants were not measured. This study was made in alcohol consumers in basal conditions; therefore, it does not take into account situations such as recovery from metabolic stress. Myocardial antioxidant evaluation is limited to the enzyme activities reported and measurement of total antioxidant status. Because myocardial biopsy was taken only in the left ventricular apex, this study did not consider architectural or functional changes within different sites of the myocardium. Because of the abstinence from alcohol established in the period comprised from hospital admission to heart donation, acute effects of alcohol on antioxidant myocardial activities could not be considered in this study.

RESULTS

Clinical Data

A total of 23 chronic alcoholics, 27 individuals with long-standing essential hypertension, and 11 control donors were evaluated. Table 1 shows the epidemiological and clinical data of the patients. The groups of patients were similar in age distribution, with male predominance in the groups of alcoholic and hypertensive patients. Cerebrovascular disease was the main cause of death in alcoholics and hypertensive patients, whereas cranial trauma was in the control group. Time from hospital admission to organ extraction was similar in all three groups. Chronic alcoholics reported a mean daily ethanol consumption of 165 ± 43 g during a period of 25.1 ± 5.4 years (lifetime dose of ethanol of 21.3 ± 5.6 kg ethanol/kg body weight; Table 1). The patients from the other groups reported a maximum daily ethanol intake of 20 g/day. Alcoholic patients reported a greater active smoking habit with a mean of 35 ± 12

Table 2. Myocardial Antioxidant Enzyme Activity and Biochemical and Nutritional Data of Patients

	Controls (<i>n</i> = 11)	Alcoholics (<i>n</i> = 23)	Hypertensives (<i>n</i> = 27)
Total antioxidant status (mmol/g × 10 ²)	0.61 ± 0.21	0.58 ± 0.32	0.58 ± 0.17
Glutathione reductase (mU/g)	16.9 ± 3.1	17.8 ± 6.5	18.6 ± 6.0
Glutathione peroxidase (mU/g)	119.2 ± 41.6	116.0 ± 34.6	123.2 ± 44.0
Superoxide dismutase (mU/g)	4.86 ± 0.84	5.43 ± 0.70	5.21 ± 0.45
Body mass index (kg/m ²)	25.8 ± 3.4	26.7 ± 4.4	28.5 ± 7.0
Total protein (g/liter)	62.8 ± 10.1	56.3 ± 8.5*	61.1 ± 8.3
Albumin (g/liter)	36.2 ± 8.0*	28.0 ± 6.7**	34.9 ± 6.9
Aspartate aminotransferase (U/liter)	36.8 ± 17.0	60.8 ± 40.5**	35.3 ± 32.6
Alanine aminotransferase (U/liter)	24.0 ± 7.0	38.3 ± 23.0	27.1 ± 27.1
γ-glutamyl transpeptidase (U/liter)	23.6 ± 15.2	110.0 ± 112.5***	32.1 ± 32.3
Bilirubin (mg/dl)	0.89 ± 0.44	1.05 ± 0.91	1.01 ± 0.88
Creatine kinase (U/liter)	174 ± 138	274 ± 130	217 ± 229
Lactate dehydrogenase (U/liter)	546 ± 197	438 ± 180	457 ± 247
Leukocyte count (× 10 ¹² /liter)	9.95 ± 2.63	11.49 ± 2.98	11.54 ± 3.58
Lymphocyte count (× 10 ¹² /liter)	1.13 ± 0.77	1.13 ± 0.58	0.91 ± 0.71
Hemoglobin (g/liter)	117 ± 12	123 ± 19	120 ± 14
Platelet count (× 10 ⁹ /liter)	186 ± 62	149 ± 61	174 ± 54
Prothrombin activity (%)	72.9 ± 14.5	75.0 ± 20.9	81.3 ± 15.6

Data are expressed as mean ± SD.

p* < 0.05, *p* = 0.01, ****p* < 0.001 compared with controls and hypertensive patients.

packets-year, compared with hypertensive and control donors (*p* < 0.001, both).

Evaluation of the clinical history revealed that all controls were had an NYHA functional class of I. Five (22%) of the 23 chronic alcoholics had an NYHA class of II, and two others (9%) had an NYHA class of III. In the group of hypertensive patients, 11 (41%) had an NYHA class of II, and 5 (18%) had an NYHA class of III or IV. Neither controls nor alcoholics had received any regular medication during the 3 months before admission. By contrast, most of hypertensive patients were already under maintenance treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors at the usual doses (*n* = 25) and/or diuretics (*n* = 4). Both alcoholic and chronic hypertensive patients presented a greater cardiothoracic index than controls (Table 1). The electrocardiogram was normal in all controls but one, who showed signs of left ventricular hypertrophy, being abnormal in 11 alcoholics (48%) and 20 chronic hypertensive patients (74%) who showed changes in ST wave, conduction defects, and signs of left ventricular hypertrophy.

Nutritional Data

With respect to nutritional parameters (Table 2), BMI was comparable in all the groups studied. Only two patients with chronic alcoholism and one case with hypertension exhibited signs of caloric malnutrition. Regarding protein nutritional parameters, alcoholics showed a lower mean total serum protein and albumin concentrations compared with controls and hypertensive patients. Alcoholics showed higher concentrations of aspartate aminotransferase and γ-glutamyl transpeptidase compared with the other groups. Serum muscle enzymes were similar in all groups. Abdominal ultrasonography results were normal in 10 of 11 controls and 24 of 27 hypertensive patients, with the remaining patients showing signs of fatty liver. By contrast, 16 of 23 alcoholics showed a diffuse disruption of liver structure. A

liver biopsy was performed in all patients with abnormal ultrasonography, and the histological analysis disclosed 15 cases of fatty liver, 3 with alcoholic hepatitis, and the remaining 2 had liver cirrhosis (Child-Pugh A stage).

Cardiac Evaluation

According to the reported criteria described in the Materials and Methods section, 11 chronic alcoholics (46%) and 16 individuals with essential hypertension (59%) had dilated cardiomyopathy (cardiothoracic index ≥ 0.48). Table 3 discloses cardiac functional data of the subgroups of patients according to the presence or absence of dilated cardiomyopathy. All alcoholics and hypertensive patients with an NYHA class of II to IV had enlarged hearts. No differences in nutritional data were observed among the subgroups of patients. In accord with previous studies, alcoholic patients with dilated cardiomyopathy had significantly greater daily and lifetime ethanol intakes compared with those without heart enlargement.

Myocardial Histological Analysis

Histological evaluation of myocardial samples from controls was normal, except for slight signs of myocyte hypertrophy and interstitial fibrosis in one specimen (Table 4). Most patients with cardiomyopathy had myocyte cell and/or nuclear hypertrophy, and two thirds demonstrated interstitial fibrosis. By contrast, patients without cardiomyopathy exhibited myocyte abnormalities in only approximately one third of the cases. No differences were observed in the analysis of the histological parameters with respect to the origin of cardiomyopathy.

Myocardial Oxidative Studies

Myocardial oxidative data are reported in Table 2. We did not find differences in total antioxidant status, glutathi-

Table 3. Myocardial Functional Data and Antioxidant Enzyme Activities According to the Presence of Cardiomyopathy

	Alcoholics Without CMP (n = 12)	Alcoholics With CMP (n = 11)	Hypertensives Without CMP (n = 11)	Hypertensives With CMP (n = 16)
Cardiothoracic index	0.48 ± 0.02	0.59 ± 0.06*	0.49 ± 0.01	0.56 ± 0.04*
Left ventricle ejection fraction (%) ^a	59 ± 3	38 ± 6*	61 ± 3	39 ± 5*
Abnormal ECG (n, %)	5 (42)	6 (55)	4 (36)	16 (100)*
Liver echosonogram (abnormal, %)	7 (58)	9 (82)	1 (9)	2 (12)
Liver cirrhosis (n, %)	1 (8)	1 (9)	0	0
Daily ethanol intake (g)	146 ± 36	188 ± 51***	12 ± 4	13 ± 4
Period of ethanol intake (yr)	24.5 ± 5.6	25.3 ± 5.3	5.9 ± 6	6.4 ± 5
Lifetime dose of ethanol (kg ethanol/kg body weight)	19.2 ± 6.3	23.3 ± 4.9***	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Total antioxidant status (mmol/g × 10 ²)	0.57 ± 0.52	0.53 ± 0.17	0.58 ± 0.15	0.57 ± 0.02
Glutathione reductase (mU/g)	17.9 ± 8.9	17.6 ± 2.6	18.5 ± 6.7	18.7 ± 5.7
Glutathione peroxidase (mU/g)	108.0 ± 44.8	124.6 ± 16.5	122.8 ± 42.5	123.5 ± 46.5
Superoxide dismutase (mU/g)	4.87 ± 0.65	5.99 ± 0.76**,*	4.53 ± 0.93	5.73 ± 1.06**,*

Data expressed as mean ± SD.

^a Left ventricle ejection fraction was obtained in 32 subjects.

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with patients without cardiomyopathy for each group; *** $p = 0.03$ compared with alcoholics without cardiomyopathy; **** values were different from those of controls ($p < 0.05$).

Table 4. Myocardial Histological Analysis in the Donors

	Controls (n = 11)	Alcoholics Without CMP (n = 12)	Alcoholics With CMP (n = 11)	Hypertensives Without CMP (n = 11)	Hypertensives With CMP (n = 16)
Myocyte cell hypertrophy (n, %)	1 (9)	3 (25)	7 (64)*	3 (27)	12 (66)*
Myocyte nuclear hypertrophy (n, %)	1 (9)	4 (33)	7 (64)	5 (45)	14 (81)*
Myocyte necrosis (n, %)	0	2 (17)	3 (27)	2 (18)	3 (19)
Interstitial fibrosis (n, %)	1 (9)	4 (33)	6 (55)	4 (36)	12 (66)
Degree of histological lesion (n, %)					
Normal	10 (91)	8 (66)	1 (9)*	8 (73)	1 (6)**
Mild	1 (9)	2 (17)	6 (54)	2 (18)	9 (56)
Moderate	0	2 (17)	3 (27)	1 (9)	4 (25)
Severe	0	0	1 (9)	0	2 (12)

Data are expressed as number of patients (percentage).

* $p < 0.05$, ** $p = 0.01$ compared with patients without cardiomyopathy for each group.

one reductase, glutathione peroxidase, or superoxide dismutase activity among the groups of patients. When considering the subgroups of alcoholics (Table 3), we observed that superoxide dismutase activity was greater in those with dilated cardiomyopathy, compared with alcoholics without cardiomyopathy and controls ($p < 0.01$, both). Similarly, hypertensive donors with dilated cardiomyopathy showed higher myocardial superoxide dismutase activity compared with those without cardiomyopathy ($p = 0.005$) and controls ($p = 0.04$). The concentrations of the other oxidative parameters were similar among the subgroups of patients. The degree of increased superoxide dismutase activity was comparable in patients with cardiomyopathy irrespective of alcoholic and hypertensive origin (means of 21% and 19%, respectively).

Considering all donors, we observed a relation between superoxide dismutase myocardial enzyme activity and cardiothoracic index ($r = 0.45$, $p < 0.01$). In addition, superoxide dismutase activity was greater in patients with a higher degree of histological myocardial damage (4.71 ± 0.80 vs. 5.78 ± 0.96 mU/g for normal-mild versus moderate-severe changes, respectively; $p < 0.001$). No relation was observed between the different cardiac antioxidant enzyme activities studied and parameters of nutritional status and alcohol consumption (daily dose of alcohol, duration of alcoholism, or total lifetime dose of alcohol).

DISCUSSION

The current study shows that antioxidant enzyme activity is partially disturbed in the presence of cardiac damage, related to either alcoholic or hypertensive origin. It was previously supposed that a reduction in plasmatic vitamin and nonvitamin antioxidant content, in parallel with chronic alcohol consumption, were implicated in the pathogenesis of alcohol-mediated tissue damage (Ansell et al., 1994; Bjerneboe and Bjerneboe, 1993; Bjerneboe et al., 1988; García-Buñuel, 1984; Ward and Peters, 1992). However, in a previous case-control study, with direct measurements of the skeletal muscle antioxidant contents of α -tocopherol, ascorbic acid, and retinol in alcoholics, we did not observe differences in the vitamin-dependent muscle antioxidant content in chronic alcohol consumers compared with nonalcoholic controls (Fernández-Solà et al., 1998). On the other hand, nonvitamin antioxidant factors have been involved in the pathogenesis of ischemic and idiopathic cardiomyopathies (Mak and Newton, 2001; McMurray et al., 1990; Siverski-Lliskovic et al., 1994), but no study has analyzed its implication in the development of alcoholic dilated cardiomyopathy.

The current study, performed in myocardial tissue from 51 human organ donors, evaluates the myocardial antioxidant content and antioxidant enzyme superoxide dis-

mutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase activity and their relation to the degree of alcohol consumption, nutritional status, and the presence of functional or histological myocardial damage either of alcohol or hypertensive origin. We observed that chronic alcohol consumers as well as hypertensive individuals with dilated cardiomyopathy showed a 20% increase in myocardial superoxide dismutase activity compared with those patients without cardiomyopathy and control donors. However, total antioxidant status content and the activity of the other enzymes studied were similar in all groups. This increase in myocardial superoxide dismutase enzyme activity in chronic alcoholic and hypertensive donors was directly related to cardiac size and the degree of myocardial histology changes but was shown to be independent of parameters of alcohol consumption such as the period of ethanol intake or the cumulated lifetime dose of ethanol consumed or conventional nutritional parameters.

The findings of the current study do not corroborate previous data showing an increase in plasma antioxidant activity in experimental animals treated with ethanol (Edes et al., 1986; Fosslie, 2003; Kannan et al., 2004). Overexpression of serum superoxide dismutase has also been described in relation to alcohol consumption and abstinence (Thome et al., 1997a), a situation that can sensitize cells to oxidative injury (Rando et al., 1998). In the same sense, we had already observed that superoxide dismutase increased in muscle tissue from chronic alcoholics with myopathy (Fernández-Solà et al., 2002). Regarding cardiac tissue, several authors have reported an increase in superoxide dismutase activity in patients with many causes of cardiomyopathy of idiopathic origin (Ball and Sole, 1998; Baumer et al., 2000; Belch et al., 1991; Dhalla et al., 1996). This finding may be a common adaptive response to myocardial damage (Mak and Newton, 2001). In fact, under some circumstances of overload or tissue damage, the healthy heart has been shown to increase its antioxidant production and to be, with time, protected from further sources of oxygen free radicals (Fosslie, 2003). In experimental studies, dilated cardiomyopathy developed in mice lacking the mitochondrial antioxidant enzyme manganese-superoxide dismutase (Fosslie, 2003).

The pathogenic influence of superoxide dismutase disruption on diseases related to alcohol intake such as brain atrophy, peripheral neuropathy, pancreatitis (Szuster-Cieleska et al., 2001), and liver fibrogenesis (Thome et al., 1997b; Zhao et al., 1996), as well as its relation with the development of induction of apoptosis, have been speculated (Deng and Cadet, 2000). Therefore, similar to what happens in these other tissues, it seems reasonable to consider the possible implication of these superoxide dismutase enzyme disturbances in alcohol-induced cardiomyopathy. However, it remains to be elucidated whether the changes in tissue antioxidant activity are consequence of the deleterious effects of alcoholism or an adapting response of the cells.

Remarkably, antioxidant evaluation in the current study is restricted to evaluation of basal total antioxidant status capacity and measurement of the enzyme activities tested, without evaluating other potential mechanisms or situations of antioxidant damage, such as recovery from metabolic stress (Cederbaum, 2001). In addition, the acute effect of ethanol consumption on myocardial antioxidant content could not be considered because of the period of alcohol abstinence established from the time of hospital admission to organ donation.

We conclude that patients with dilated cardiomyopathy, related to either alcoholic or hypertensive origin, show an increased myocardial superoxide dismutase activity, a fact probably related to the development of myocardial structural and functional damage. Further studies should assess the role of other factors not directly measured in this study, such as myocardium site-specific changes in antioxidant status/oxidative damage and antioxidant content of the diet or the alcoholic beverages.

REFERENCES

- Adachi J, Asano, M, Ueno Y, Reilly M, Mantle P, Peters TJ, Preedy VR (2000) 7- α and 7 β -Hydroxycholesterol-5-en 3 β -ol in muscle as indices of oxidative stress: Response to ethanol dosage in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24:675–681.
- Ansell H, Reilly ME, Patel VB, Heap LC, Peters LC, Preedy VR (1994) Antioxidant status in skeletal muscle and plasma of rats treated with ethanol. *Biochem Soc Trans (Suppl 4)* 22:442S.
- Ball AMM, Sole MJ (1998) Oxidative stress and the pathogenesis of heart failure. *Cardiol Clin* 16:665–675.
- Baumer AT, Flesh M, Wang X, Shen Q, Feuersein GZ, Böhm M (2000) Antioxidant enzymes in human hearts with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 32:121–130.
- Belch JJ, Bridges A, Scott N, Chopra M (1991) Oxygen free radical and congestive heart failure. *Br Heart J* 65:245–248.
- Beckemeier ME, Bora PS (1998) Fatty acid ethyl esters: Potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 30:2487–2494.
- Beyer W, Imlay J, Fridovich I (1991) Superoxide dismutase assay. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40:221–253.
- Bjorneboe GE, Johnsen J, Bjorneboe A, Marklund SL, Skylv N, Hoiseth A, Bache-Wiig JE, Morland J, Drevon CA (1988) Some aspects of antioxidant status in blood from alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 12:806–810.
- Bjorneboe A, Bjorneboe GE (1993) Antioxidant status and alcohol-related diseases. *Alcohol Alcohol* 28:111–116.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Calberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:485–490.
- Cederbaum AI (2001) Introduction-serial review: Alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radic Biol Med* 313:1524–1526.
- Deng X, Cadet JL (2000) Methamphetamine-induced apoptosis is attenuated in the striata of copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 83:121–124.
- Dhalla AK, Hill MF, Singal PK (1996) Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28:506–514.
- Edes I, Toszegi A, Csanady M, Bozoky B (1986) Myocardial lipid peroxidation in rats after chronic alcohol ingestion and the effects of different antioxidants. *Cardiovasc Res* 20:542–548.

- Fernández-Solà J, Estruch R, Grau JM, Paré JC, Rubin E, Urbano-Márquez A (1994) The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 120:529–536.
- Fernández-Solà J, Estruch R, Urbano-Márquez A (1997) Alcohol and heart muscle disease. *Addict Biol* 2:9–17.
- Fernández-Solà J, Villegas E, Nicolás JM, Deulofeu R, Antúnez E, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Márquez A (1998) Serum and muscle levels of alpha-tocopherol, ascorbic acid and retinol are normal in chronic alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 22:422–427.
- Fernández-Solà J, Garcia G, Elena M, Tobías E, Sacanella E, Estruch R, Nicolas JM (2002) Muscle antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1858–1862.
- Fosslien E (2003) Mitochondrial medicine-cardiomyopathy caused by defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 33:371–395.
- García-Buñuel L (1984) Lipid peroxidation in alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *Med Hypoth* 13:217–231.
- Goldman L, Hashimoto B, Cook F, Loscalzo A (1981) Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: Advantages of a new specific activity scale. *Circulation* 64:1227–1234.
- Kannan M, Wang L, Kang YJ (2004) Myocardial oxidative stress and toxicity induced by ethanol exposure in mice. *Exp Biol Med* 229:553–559.
- Mak S, Newton GE (2001) The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. *Chest* 120:2035–2046.
- Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998) Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F_{2α} in pericardial fluid of patients with heart failure: A potential role of in vivo antioxidant stress in ventricular dilatation and progression of heart failure. *Circulation* 97:1536–1539.
- McDonough KH (1999) The role of alcohol in the oxidant-antioxidant balance in the heart. *Front Biosci* 4:D601–D606.
- McMurray J, McLay J, Chopra M, Bridges A, Belch JJF (1990) Evidence for enhanced free-radical activity in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 65:1261–1262.
- Moushmouth B, Ali-Mansour P (1991) Alcohol and the heart: The long-term effects of alcohol on the cardiovascular system. *Arch Intern Med* 151:36–42.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornsquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334:1150–1155.
- Powers SK, Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58:1025–1033.
- Preedy VR, Patel VB, Reilly M, Richardson PJ, Falkous G, Mantle D (1999) Oxidants, antioxidants and alcohol: Implications for skeletal and cardiac muscle. *Front Biosci* 4:58–66.
- Preedy VR, Adachi J, Asano M, Koll M, Mantle D, Niemela O, Parkkila S, Paice AG, Peters T, Rajendran R, Seitz H, Ueno Y, Worrall S (2001) Free radicals in alcoholic myopathy: Indices and preventive study. *Free Radic Biol Med* 32:683–687.
- Rando TA, Crowley RS, Carlson EJ, Epstein CJ, Mohapatra P (1998) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase: A novel cause of murine muscular dystrophy. *Ann Neurol* 44:361–368.
- Siverski-Lliskovic N, Kaul N, Singal PK (1994) Probuocol promotes endogenous antioxidants and provides protection against Adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* 89:2829–2835.
- Sobell LC, Maisto SA, Sobell MB, Cooper AM (1979) Reliability of alcohol abusers' self-reports of drinking behavior. *Behav Res Ther* 17:157–160.
- Szuster-Cieleska A, Daniluk J, Kandfer-Szarszen M (2001) Oxidative stress in blood of patients with alcohol-related pancreatitis. *Pancreas* 22:261–266.
- Sun AY, Ingelman-Sundberg M, Neve E, Etienne N, Matsumoto H, Nishitani, Y, Minowa Y, Fukui Y, Shannon BM, Patel VB, Cunningham CC, Zima T, Fialova L, Mikulikova L, Popov P, Malbohan I, Janebova M, Nespor K, Sun GY (2001) Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res (Suppl 5)* 25:237S–243S.
- Thome J, Nara K, Foley P, Gsell W, Wiesbeck GA, Boning J, Riederer P (1997a) Time course of manganese superoxide dismutase concentrations in serum of alcohol-dependent patients during abstinence. *Drug Alcohol Depend (Ireland)* 32:65–69.
- Thome J, Foley P, Gsell W, Davids E, Wozarz N, Wiesbeck GA, Bonning J, Riederer P (1997b) Increased concentrations of manganese superoxide dismutase in serum of alcohol-dependent patients *Alcohol Alcohol* 2:65–69.
- Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont L (1989) The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 320:409–411.
- Urbano-Márquez A, Estruch R, Fernández-Solà J, Nicolás JM, Paré JC, Rubin E (1995) The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and myopathy in women compared with men. *JAMA* 274:149–154.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L (1995) Glutathione peroxidase assay. *Methods in Enzymol* 252:38–53.
- Vanderberg DF, Skorton DJ (1989) Recent advances in echocardiography. *Curr Opin Cardiol* 4:815–823.
- Ward RJ, Peters T (1992) The antioxidant status of patients with either alcohol-induced liver damage or myopathy. *Alcohol Alcohol* 27:359–365.
- Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S, Saydam G, Canatan H, Senes M, Topkaya BC, Nebioglu S (1998) Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 44:148–154.
- Zhao M, Matter K, Laissue JA, Zimmermann A (1996) Copper/zinc superoxide dismutase in alcoholic liver disease: Immunohistochemical quantitation. *Histol Histopathol* 11:899–907.

RESUM DE L'ARTICLE: "Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism."

En el present estudi s'ha valorat l'estat antioxidant del miocardi en pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol i la possible relació d'aquest balanç antioxidant amb lesió miocàrdica.

S'han mesurat l'activitat enzimàtica de superòxid dismutasa (SOD), glutathion peroxidasa (GP) i glutathion reductasa (GR) així com l'estat antioxidant total en mostres de miocardi humà (no aptes per a trasplantament) de donants). El grup d'estudi ha estat: 23 consumidors crònics excessius d'alcohol, 27 pacients amb hipertensió arterial de llarga evolució i 11 controls sans. La presència de miocardiopatia s'ha definit per criteris funcionals i histològics.

Els pacients amb miocardiopatia, tant els d'origen alcohòlic com hipertensiu, han mostrat un augment en l'activitat en el miocardi de la superòxid dismutasa comparat amb pacients sense miocardiopatia ($p < 0.001$ ambdós) i amb els controls ($p < 0.05$ ambdós). S'ha pogut relacionar l'activitat de la SOD amb el grau de dany miocàrdic ($p < 0.001$) i l'allargament de les fibres miocàrdiques ($p < 0.01$). En canvi, l'activitat de la glutathion peroxidasa i de la glutathion reductasa, ha estat similars en tots els grups. Finalment no s'ha pogut establir relació entra la capacitat antioxidant miocàrdica total i els paràmetres nutricionals o el consum acumulat d'alcohol.

Concloem, doncs, que els pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol que desenvolupen miocardiopatia dilatada mostren un augment de l'activitat de la SOD, probablement en relació amb dany funcional i estructural del miocardi.

7. DISCUSSIÓ

La miocardiopatia dilatada alcohòlica és una malaltia d'etiologia multifactorial que ha estat abordada principalment a partir de models animals, amb totes les limitacions que això significa i que ja hem esmentat àmpliament a la introducció. Els mecanismes que s'han proposat per a entendre aquesta malaltia inclouen, entre d'altres, alteracions dels miòcits amb fenòmens d'apoptosi, disfunció d'òrganel·les intracel·lulars, principalment en el mitocondris, alteració de les proteïnes contràctils, trastorns del metabolisme del calci, modificacions en l'estat oxidatiu, alteracions metabòliques i nutricionals i trastorns del sistema neurohormonal.

La present tesi ha focalitzat l'atenció concretament en tres d'aquests mecanismes: l'alteració dels canals de calci tipus-L, el fenomen de l'apoptosi i l'estrès oxidatiu. Ha estat així per l'evidència en treballs previs de la rellevància d'aquests mecanismes (78-84, 66-68, 85-92) i per la pròpia experiència del grup en l'estudi dels mecanismes fisiopatogènics en la miopatia alcohòlica esquelètica (90, 95, 139-143). La correlació entre dany esquelètic per alcohol i dany miocàrdic feia pensar en la implicació dels mateixos factors patogènics (146).

En l'estudi dels canals de calci tipus-L (CC-L) la hipòtesi inicial va ser que, igual que havia descrit prèviament Guppy i Littleton en models amb rates (80, 81, 107), l'exposició a alcohol donava lloc a una sobre-expressió d'aquests canals també en el miocardi humà. El nostre grup ja havia demostrat prèviament en un estudi de múscul esquelètic amb rates que l'exposició aguda a alcohol donava lloc a una disminució dels fluxs de calci intracel·lulars,

postulant-se que el mecanisme que originava aquest fenomen podria trobar-se en problemes de permeabilitat de la membrana citoplasmàtica, en disfuncions del reticle sarcoplasmàtic o bé en els canals de calci voltatge-depenent (143). En el present estudi es va voler avançar una passa més en aquesta direcció i aprofundir en el rol dels CC-L en la etiopatogènia de la MCPA. Per a fer-ho es van realitzar tan tècniques isotòpiques per *binding* amb dihidropiridina com mesures morfomètriques. La presència de la sobre-expressió dels CC-L es va determinar a través de la mesura de la B_{max} (fmol/mg proteïna), mentre que la dinàmica del canal es va mesurar a través de la constant de dissociació (K_d ; nM). Es va poder demostrar que, efectivament, els pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol sense MCPA presentaven una augment estadísticament significatiu de l'expressió d'aquests receptors de calci quan es comparava amb el grup de pacients control. També es va comparar el grup amb consum crònic excessiu d'alcohol sense MCPA amb el que sí que presentava MCPA i es va poder comprovar que el primer presentava una sobre-expressió estadísticament significativa dels receptors respecte aquest segon. En canvi la comparació dels pacient amb MCPA i els controls no va mostrar diferències estadísticament significatives. La mesura de la dinàmica dels CC-L va confirmar que el grup amb consum crònic excessiu d'alcohol sense MCPA tenia una K_d significativament diferent i superior que el grup control o el grup amb MCPA, mentre que no hi havia diferències entre aquests dos darrers grups. Per altre banda el treball va analitzar els canvis morfomètrics per l'exposició crònica a alcohol. Es va demostrar un augment estadísticament significatiu de l'àrea i del perímetre dels miòcits del grup amb MCPA respecte al grup sense MCPA i el grup control degut a la presència d'hipertròfia miocàrdica, però es va poder

comprovar que això no afectava la mesura de l'expressió dels CC-L. Una de les possibles explicacions a les troballes d'aquest treball passaria per contemplar la resposta del miocardi a l'exposició crònica de dosis tòxiques d'alcohol. En un primer moment la resposta del miocardi seria la sobre-expressió dels CC-L; durant aquesta fase el pacient no presentaria ni els símptomes ni els signes de la MCPA i el pacient pertanyeria al grup de pacients amb consum crònic excessiu d'alcohol sense MCPA. Així aquesta sobre-expressió es podria entendre com un mecanisme compensatori a l'acció tòxica de l'alcohol que preservaria la funcionalitat cardíaca, mantenint la contractilitat miocàrdica a expences d'augmentar els receptors de calci-L en la membrana citoplasmàtica. La persistència en el temps a una exposició tòxica donaria pas a una segona fase on aquest mecanisme compensatori s'esgotaria; llavors deixariem de detectar la sobre-expressió dels CC-L i el pacient presentaria una MCPA, amb dany estructural progressiu mentre romangués el consum d'alcohol. L'ús de miocardi humà ha permès, no sols confirmar la presència de la sobre-expressió dels CC-L, sinó la seva dinàmica en un model d'exposició crònica. Així s'ha pogut observar la presència i expressió del CC-L en el grup control, la seva sobre-expressió en els pacient alcohòlics sense miocardiopatia i, finalment, la desaparició d'aquesta sobre-expressió un cop s'instaura la MCPA estructural. Una crítica plausible a la interpretació de les dades que acabem de postular passaria per considerar la desaparició de la sobre-expressió dels CC-L en el grup amb MCPA no com una causa de que originés la miocardiopatia sinó com una conseqüència de la mateixa, com un signe més de l'alteració del miocardi a l'insult tòxic de l'alcohol. En aquest sentit caldrà dissenyar estudis encaminats a demostrar un augment de l'expressió de RNAm dels canals així com la seva

comparació amb altres models de MCP dilatada no alcohòlica però amb dany estructural similar.

Totes aquestes troballes confirmen novament el paper destacat que ocupa el metabolisme del calci en la comprensió de les patologies que originen disfunció miocàrdica i relacionen de forma consistent la dinàmica dels canals de calci amb la fisiopatogènia de la miocardiopatia alcohòlica.

En l'estudi del fenomen de l'apoptosi es va considerar com a punt de referència un treball previ del nostre grup en múscul esquelètic en el que es va demostrar la presència d'una augment de l'apoptosi en els subjectes amb consum crònic excessiu d'alcohol (140). A la literatura hi ha treballs que han relacionat clarament la presència d'apoptosi amb cardiopatia dilatada d'altres etiologies (116) però pràcticament no hi ha treballs previs que s'hagin centrat en l'estudi de la MCPA. Per a valorar la presència d'apoptosi es va utilitzar la tècnica de TUNEL i es van mesurar BAX i BCL-2 com dos dels elements fonamentals que participen en la regulació d'aquest procés. Els grups d'estudi van incloure pacients amb miocardiopatia hipertensiva, fet que va permetre comparar l'apoptosi en dues cardiomiopaties d'origen distint. Els resultats van demostrar que quan es va mesurar el TUNEL comparant els grups controls, alcohòlics i hipertensos de forma global no es trobaven diferències estadísticament significatives. En canvi, quan es van mesurar els subgrups amb miocardiopatia, tant si era d'origen alcohòlic com hipertensiu, l'índex d'apoptosi per TUNEL estava clarament augmentat respecte als controls i als pacients sense miocardiopatia. Pel que fa a l'expressió de BAX i BCL-2, ambdós van ser significativament superiors en els grups alcohol i hipertensiu respecte al control tot i que, quan els dos primers grups es van subdividir

segons la presència o no de miocardiopatia, les diferències van ser encara molt més rellevants. Així, l'expressió de BAX i BCL-2 era més elevada en els pacients amb miocardiopatia (indistintament de quin fos el seu origen). El treball també va relacionar la presència de dany histològic amb el grau d'apoptosi i, indistintament de si la miocardiopatia era d'origen alcohòlic o hipertensiu, es va poder comprovar la presència d'un augment creixent estadísticament significatiu de TUNEL, BAX i BCL-2 a mesura que hi havia més lesió histològica, de manera que la presència màxima d'apoptosi es va trobar quan la lesió histològica era moderada o severa. Semblaria clar, doncs, que la presència d'apoptosi estaria en relació a la presència de miocardiopatia estructural, indistintament de la seva etiologia, i que la seva rellevància seria més destacada en els casos on hi hagués més danys histològic. En quin grau l'apoptosi participaria en aquesta lesió histològica o en seria conseqüència tornaria a ser motiu per a plantejar estudis que aprofundissin en aquest sentit. L'alcohol, en aquest context, s'hauria de considerar un insult inespecífic pel teixit miocàrdic, com podria ser-ho la hipertensió arterial crònica o la isquèmica i, per tant, l'apoptosi podria interpretar-se com un mecanisme general no específic a través del qual l'alcohol generaria lesió miocàrdica. Malgrat això, hi ha una troballa en el treball que podria insinuar que l'alcohol efectivament és un inductor de l'apoptosi; quan es va analitzar un subgrup dins del grup de pacients amb consum excessiu d'alcohol es va evidenciar que aquells que presentaven una classe clínica de la NYHA-1, és a dir, que presentaven un funcionalisme cardíac igual que els controls, mostraven una expressió significativament superior de BAX i BCL-2 respecte al grup control. En canvi, no hi havia diferències estadísticament significatives entre el grup alcohol i el grup

amb miocardiopatia hipertensiva per aquest subgrup concret. Per tant podria interpretar-se que l'alcohol és un inductor dels mecanismes d'apoptosi i que aquests apareixen prèviament a l'aparició de les alteracions funcionals del miocardi. És a dir, que l'apoptosi en els subjectes alcohòlics precediria a l'aparició de disfunció miocàrdica, cosa que no succeïa mostrar en el grup amb miocardiopatia hipertensiva.

En resum, totes aquestes troballes confirmarien la presència d'un augment significatiu de l'apoptosi en els pacient amb miocardiopatia alcohòlica, però difícilment es podria considerar aquest mecanisme com específic d'una acció tòxica de l'alcohol. La presència d'un augment de BAX i BCL-2 en un subgrup d'alcohòlics assenyalaria a l'apoptosi com un dels mecanismes etiopatogènics de la MCPA més que no pas una conseqüència, però caldria aprofundir en aquesta perspectiva dissenyant nous treballs en aquesta direcció.

L'estudi de l'estrès oxidatiu en el miocardi de consumidors crònics excessius d'alcohol tenia un precursor en el nostre grup de recerca en el múscul esquelètic (90), on es va poder establir la presència d'una disminució de la glutatión peroxidasa (GP) amb un augment de la superòxid dismutasa (SOD). Altres estudi previs del grup, com el de Fernández-Solà et al. sobre la influència de les substàncies antioxidant dependents de vitamines, havien conclòs que no hi havia diferències en la quantificació de les mateixes en múscul esquelètic entre el grup amb consum excessiu d'alcohol i el grup control (144). Això semblava contradir estudis previs que relacionaven el dany tissular amb el dèficit de factors antioxidant vitamina-depenents (145). En el present treball es va mesurar en miocardi humà d'un grup control, un grup amb consum excessiu d'alcohol i un grup amb hipertensió crònica, l'activitat antioxidant total

així com l'activitat de glutatión peroxidasa (GP), superòxid dismutasa (SOD) i glutatión reductasa (GR). La inclusió del grup hipertensiu va permetre, com en el treball precedent, valorar les troballes comparant dues miocardiopaties d'origen diferent. Com s'havia postulat no es va trobar relació estadísticament significativa entre la capacitat antioxidant miocàrdica total i els paràmetres nutricional o el consum acumulat d'alcohol. En la mesura de GP, SOD i GR només es van trobar diferències significatives en els nivells de SOD. Quan es va comparar el subgrup de subjectes amb miocardiopatia, indistintament si eren d'origen alcohòlic o hipertensiu, es va demostrar un augment significatiu de l'activitat de la SOD respecte al grup control i el grup sense miocardiopatia. Com en el treball de l'apoptosi, es va trobar una relació significativa entre la presència de dany miocàrdic i l'activitat de SOD, de manera que en els pacient que presentaven més lesió histològica es detectava més activitat de la SOD. D'aquest treball es desprèn que l'alcohol actuaria novament com insult inespecífic pel teixit miocàrdic, com podria ser-ho la hipertensió arterial crònica, i per tant seria difícil interpretar l'alteració del balanç oxidatiu fos un mecanisme a través del que l'alcohol generés lesió directa miocàrdica. De fet no va ser possible establir si l'augment d'activitat de la SOD era causa de lesió miocàrdica o conseqüència de la mateixa però una interpretació global de les dades de l'estudi induiria a pensar que la instauració progressiva de dany miocàrdic és el que dona lloc a una alteració de l'estrès oxidatiu i no pas al contrari.

Valorant els tres treballs de manera global, podríem concloure que dels tres mecanisme proposats, el primer, que fa referència a la dinàmica del canals de calci tipus-L, sembla ser el que presenta més evidències de participar de

manera activa en l'etiopatogènia de la miocardiopatia alcohòlica. Efectivament, s'ha pogut comprovar canvis de l'expressió dels CC-L en relació amb el consum d'alcohol i amb l'evolució de la MCPA. L'apoptosi també ha demostrat estar en relació amb la presència de miocardiopatia alcohòlica, de forma més inespecífica, tot i que hi ha alguns indicis que induirien a pensar que podria ser un mecanisme etiopatogènic de producció de la mateixa més que no pas una conseqüència. Finalment, la valoració de l'estat oxidatiu miocàrdic només ha pogut objectivar una augment de l'activitat de la SOD, més en relació a miocardiopatia que no pas com una conseqüència específica a l'exposició a alcohol, i més com una resposta a la instauració del dany miocàrdic estructural que no com a causa del mateix. Totes aquestes troballes suposen un pas endavant respecte als coneixements previs de la fisiopatologia de la MCPA, però també obren interrogants que hauran de ser abordats properament amb nous treballs, com podria ser nous factors en la regulació del procés d'apoptosi miocàrdica, com la reducció dels nivells d'Apaf-1 o l'estudi del concepte de regeneració miocàrdica que inclourien nous element a considerar en l'etiopatogènia d'una patologia complexa i multifactorial com és la miocardiopatia alcohòlica.

8. CONCLUSIONS

8.1. CONCLUSIONS PARTICULARS

8.1.2 Up-regulation of myocardial L-type Ca²⁺ channels in chronic alcoholism.

[Fatjó E, Sancho P, Fernández-Solà J, Sacanella E, Estruch R, Bataller R, Nicolás JM..

Up-regulation of myocardial L-type Ca²⁺ channel in chronic alcoholism. Department of Internal Medicine and Hepatology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions

Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Spain. Alcohol Clin Exp Res.

(Enviat; pendent acceptació)].

1. S'ha demostrat la presència de sobre-expressió de canals de calci tipus-L en subjectes amb consum crònic excessiu d'alcohol.
2. La sobre-expressió dels canals de calci tipus-L es produeix en els subjectes amb consum crònic excessiu d'alcohol sense lesió miocàrdica i no es demostra quan s'instaura la miocardiopatia alcohòlica estructural.
3. L'àrea i el perímetre dels miòcits van ser superiors en els subjectes amb consum crònic excessiu d'alcohol i afectes de miocardiopatia (respecte controls i no afectes de miocardiopatia), però això no va interferir la mesura de la sobre-expressió dels canals de calci tipus-L.

8.1.2. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy.

[Fernández-Solà J, Fatjó E, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, Urbano-Márquez A,

Nicolás JM. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. Human Pathology.

2006;37(8):1100-1110

1. L'índex miocàrdic d'apoptosi mesurada per la tècnica TUNEL va ser més elevat en els subjectes afectes de miocardiopatia indistintament de que el seu origen fos hipertensiu o alcohòlic que en els no afectes de miocardiopatia.
2. L'activitat miocàrdica de BAX i de BCL-2 va ser superior en el grup amb consum excessiu d'alcohol i hipertensos respecte el grup control. Aquesta diferència encara va ser més rellevant en el subgrup de subjectes afectes de miocardiopatia estructural.

8.1.3. Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism.

[Fatjó E, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badía E, Sacanella E, Estruch R, Nicolás JM. Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29:864-870].

1. L'estat oxidatiu total en el miocardi va ser similar entre els grups estudiats que van ser: grup control, grup amb consum excessiu d'alcohol sense miocardiopatia, grup amb consum excessiu d'alcohol afectes de miocardiopatia i grup amb hipertensió arterial crònica afectes de miocardiopatia.
2. Es va demostrar una augment de l'activitat enzimàtica de la superòxid dismutasa miocàrdica, que estava en relació amb la presència de miocardiopatia i de forma creixent amb la presència de dany histològic. L'activitat de glutathion peroxidasa i la glutathion reductasa no va mostrar diferències significatives entre els diferents grups d'estudi.

8.2 CONCLUSIÓ GLOBAL

Els tres mecanismes estudiats intervenen i es relacionen de diferent manera amb l'etiopatogènia de la miocardiopatia alcohòlica. Les alteracions en l'expressió dels canal del calci tipus-L sembla participar de forma activa com a mecanisme etiopatogènic d'adaptació en la miocardiopatia alcohòlica, mentre que l'apoptosi tindria una rellevància parcial com a inductor del dany estructural a la miocardiopatia alcohòlica i el desbalanç del estat oxidatiu semblaria ser més una conseqüència de la lesió miocàrdica que no pas una causa de la mateixa.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Arnold M.Katz. Heart Failure, fundamental mechanisms in myocardial failure. In Andrus EC, Maxwell CH, eds. *The Heart and Circulation*, Vol 1, Research. FASEB. Washington DC, pp 533-537.
2. Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* 1998;294:449-460.
3. Millevoi S, Trombitas K, Kolmerer B, Kostin S, Schaper J, Pelin K, Granzier H, Labeit S. Characterization of nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *J Mol Biol* 1998;282:111-123.
4. Linke WA, Ivemeyer M, Labeit S, Hinssen H, Ruegg JC, Gautel M. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J* 1997;73:905-919.
5. Alpert NR, Muliere LA, Hasenfuss G. Myocardial chemo-energy transduction. In Fozzard H, Haber E, Katz A, Jennigs R, Morgan HE, eds. *The Heart and Circulation*, 2nd ed. Raven Press, New York, pp 111-128.
6. Katz AM. Calcium channel diversity in the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:522-529.
7. "European alcohol active plan. OMS. 2000-2005". World Health Organization – 2000. EUR/LVNG 01 05 01. E67946.
8. Casas M., Gutierrez M, San L. *Psicopatologia i alcoholisme. Monogràfic sobre toxicomanies*. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya
9. Rodriguez ME, Cami J. Alcoholism among inpatients in a general hospital in

- Barcelona, Spain. *Int J Addict* 1988;23:29-46.
10. Rosenqvist M. Alcohol and cardiac arrhythmias. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:318S-322S.
11. Koskinen P, Kupari M. Alcohol and cardiac arrhythmias. *BMJ* 1992;304: 1394-1395.
12. Moushmouth B, Abi-Mansour P. Alcohol and the heart. The long-term effects of alcohol on the cardiovascular system. *Arch Intern Med* 1991;151:36-42.
13. 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.
14. Frost L, Vestergaard P. Alcohol and risk of atrial fibrillation or flutter: a cohort study. *Arch Intern Med* 2004;164:1993-1998.
15. 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.
16. Kupari M, Koskinen P. Time of onset of supraventricular tachyarrhythmia in relation to alcohol consumption. *Am J Cardiol* 1991;67:718-722.
17. Koskinen P, Kupari M. Alcohol consumption of patients with supraventricular tachyarrhythmias other than atrial fibrillation. *Alcohol Alcohol* 1991;26:199-206.
18. Sterner KL, Keough VA.. Holiday heart syndrome: A case of cardiac irritability after increased alcohol consumption. *J Emerg Nurs* 2003;29:570-573.

19. Menz V, Grimm W, Hoffmann J, Maisch B. Alcohol and rhythm disturbance: the holiday heart syndrome. *Herz* 1996;21:227-231.
20. Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation* 1999;100:944-950.
21. Kupari M, Koskinen P. Alcohol, cardiac arrhythmias and sudden death. *Novartis Found Symp* 1998;216:68-79.
22. Lian C. L'alcoolisme, cause d'hypertension artérielle. *Bull Acad Natl Med* 1915;74:525-528.
23. Klatsky AL, Friedman GD, Siegelau AB, Gerard MJ. Alcohol consumption and blood pressure Kaiser-Permanente Multiphasic Health Examination data. *N Engl J Med* 1977;296:1194-1200.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Stott DJ, Ball SG, Inglis GC, Davies DL, Fraser R, Murray GD, McInnes GT. Effects of a single moderate dose of alcohol on blood pressure, heart rate and associated metabolic and endocrine changes. Clin Sci (Lond) 1987;73:411-416.
29. Potter JF, Watson RD, Skan W, Beevers DG. The pressor and metabolic effects of alcohol in normotensive subjects. Hypertension 1986;8:625-631.
30. Kawano Y, Abe H, Kojima S, Ashida T, Yoshida K, Imanishi M, Yoshimi H, Kimura G, Kuramochi M, Omae T. Acute depressor effect of alcohol in patients with essential hypertension. Hypertension 1992;20:219-226.
31. Chan TC, Wall RA, Sutter MC. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. Hypertension 1985;7:519-524.
32. Arkwright PD, Beilin LJ, Vandongen R, Rouse IA, Lalor C. The pressor effect of moderate alcohol consumption in man: a search for mechanisms. Circulation 1982;66:515-519.
33. Coca A, Aguilera MT, De la Sierra A, Sanchez M, Picado MJ, Lluch MM, Urbano-Marquez A. Chronic alcohol intake induces reversible disturbances on cellular Na⁺ metabolism in humans: its relationship with changes in blood pressure. Alcohol Clin Exp Res 1992;16:714-720.
34. Kojima S, Wu ST, Wikman-Coffelt J, Parmley WW. Acute effects of ethanol on cardiac function and intracellular calcium in perfused rat heart. Cardiovasc Res 1993;27:811-816.
35. Kisters K, Schodjaian K, Tokmak F, Kosch M, Rahn KH. Effect of ethanol on blood pressure--role of magnesium. Am J Hypertens 2000;13: 455-456.

36. Pearson TA. Alcohol and heart disease. *Circulation* 1996;94:3023-3025.
37. Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, Stampfer MJ. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* 1991;338:464-468.
38. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Arky RA, Hennekens CH, Speizer FEA prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med* 1988;319:267-273.
39. Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults. *N Engl J Med* 1997;337:1705-1714.
40. Rimm EB, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999;319:1523-1528.
41. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelet aggregation and the French Paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-1526.
42. de Lorgeril M, Salen P. Wine ethanol, platelets, and Mediterranean diet. *Lancet* 1999;353:1067.
43. Muntwyler J, Hennekens CH, Buring JE, Gaziano JM. Mortality and light to moderate alcohol consumption after myocardial infarction. *Lancet* 1998;352:1882-1885.
44. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Boucher F, Paillard F, de Leiris J. Wine drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:1465-1469.

45. Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation* 1999;100:944-950 .
46. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
47. Volpato S, Pahor M, Ferrucci L, Simonsick EM, Guralnik JM, Kritchevsky SB, Fellin R, Harris TB. Relationship of alcohol intake with inflammatory markers and plasminogen activator inhibitor-1 in well-functioning older adults: the Health, Aging, and Body Composition study. *Circulation*. 2004;109(5):607-612.
48. Stewart SH. Alcohol and inflammation: a possible mechanism for protection against ischemic heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002;12:148–151.
49. 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.
50. 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.
51. 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.

52. 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.
53. 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.
54. Vital and Health Statistics. Hyattsville, MD: U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention 1995;13:122.
55. Report of the World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980;44:672–673.
56. Bollinger, O. Ueber die Haussigkeit und Ursachen der idiopathischen Herzhypertrophie in Munchen. *Disch. Med. Wochensch* 1884;10:180.
57. Fauchier L, Babuty D, Poret P, et al. Comparison of longterm outcome of alcoholic and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2000;21:306–314.
58. Kupari M, Koskinen P, Suokas A, et al. Left ventricular filling impairment in asymptomatic chronic alcoholics. *Am J Cardiol* 1990;66:1473–1477.
59. Lazarevic, AM, Nakatani S, Nesjkovic, AN, et al. Early changes in left ventricular function in chronic asymptomatic alcoholics: relation to the duration of heavy drinking. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1599–1606.
60. Askanas A, Udoshi M, Sadjadi SA. The heart in chronic alcoholism: a noninvasive study. *Am Heart J* 1980;99:9–16.
61. Silberbauer 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.
62. Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-Lopez F, et al. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 1989;320:409–415.
63. Mathews EC, Gradin JM, Henry WL, et al. Echocardiographic abnormalities in chronic alcoholics with and without overt congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1981;47:570–578.
64. Urbano-Marquez A, Estruch R, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Pare JC, Rubin E. The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and myopathy in women compared with men. *JAMA* 1995;274:149-154.
65. Fernández-Solà J, Estruch R, Nicola's J-M, et al. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am J Cardiol* 1997;80:481–485.
66. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circulation* 1998;82:1111–1129.
67. Chen DB, Wang L, Wang PH. Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci* 2000;67:1683–1693.
68. Jänkälä H, Eklund KK, Kokkonen JO, et al. Ethanol infusion increases ANP and p21 gene expression in isolated perfused rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:328–333.
69. Alexander CS. Electron microscopic observations in alcoholic heart muscle disease. *Br Heart J* 1967;29:200–206.
70. Tsiplenkova VG, Vihert AM, Cherpachenko NM. Ultrastructural and

- histochemical observations in human and experimental alcoholic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:27A–32A.
71. Beckemeier ME, Bora PS. Fatty acid ethyl esters potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2487–2494.
72. Segel LD, Rendig SV, Mason DT. Alcohol-induced hemodynamic and Ca²⁺ flux dysfunctions are reversible. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:443–455.
73. Bing RJ, Tillmanns H, Fauvel JM, et al. Effect of prolonged alcohol administration on calcium transport in heart muscle of the dog. *Circ Res* 1974;35:33–38.
74. Preedy VR, Peters TJ. The acute and chronic effects of ethanol on cardiac muscle protein synthesis in the rat in vivo. *Alcohol* 1990; 7:97–102.
75. Preedy VR, Patel VB, Why HJF, et al. Alcohol and the heart: biochemical alterations. *Cardiovasc Res* 1996;31:139–147.
76. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215–262.
77. Meehan J, Piano MR, Solaro RJ, et al. Heavy long-term ethanol consumption induces an β - to α -myosin heavy chain isoforms transition in rat. *Basic Res Cardiol* 1999;94:481–488.
78. Figueredo VM, Change KC, Baker AJ, et al. Chronic alcohol induced changes in cardiac contractility are not due to changes in the cytosolic Ca²⁺ transient. *Am J Physiol* 1998;275:H122–H130.
79. Piano MR, Schwertz DW, Solaro RJ, et al. Effect of pimobendan and isoproterenol in the alcoholic myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:237–242.

80. 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.
81. 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.
82. Danziger RS, Sakai M, Capogrossi MC, et al. Ethanol acutely and reversibly suppresses excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 1991;68:1660–1668.
83. Guarnieri T, Lakatta EG. Mechanism of myocardial contractile depression by clinical concentrations of ethanol. *J Clin Invest* 1990; 85:1462–1467.
84. Schulman SP, Lakatta EG, Weiss RG, et al. Contractile, metabolic and electrophysiologic effects of ethanol in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:417–426.
85. Sun AY, Ingelman-Sundberg M, Neve E, Etienne N, Matsumoto H, Nishitani, Y, Minowa Y, Fukui Y, Shannon BM, Patel VB, Cunningham CC, Zima T, Fialova L, Mikulikova L, Popov P, Malbohan I, Janebova M, Nesper K, Sun GY. Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:237S-243S.
86. Cederbaum AI. Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2001;313:1524-1526.
87. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂ζ in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role of in vivo antioxidant stress in ventricular dilatation and progression of heart failure. *Circulation* 1998;97:1536-1539.

88. Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S, Saydam G, Canatan H, Senes M, Topkaya BC, Nebioglu S. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 1998;44:148-154.
89. McDonough KH. The role of alcohol in the oxidant-antioxidant balance in the heart. *Front Biosci* 1999;4:601-606.
90. Fernández-Solà J, Garcia G, Elena M, Tobías E, Sacanella E, Estruch R, Nicolas JM. Muscle antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1858-1862.
91. Beckemeier ME, Bora PS. Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2487-2494.
92. Mak S, Newton GE. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. *Chest* 2001;120:2035-2046.
93. Trouce I, Byrne E, Dennett X. Biochemical and morphological studies of skeletal muscle in experimental chronic alcoholic myopathy. *Acta Neurol Scand* 1990;82:386–391.
94. Vernet M, Cadefau JA, Balague A, Grau JM, Urbano-Marquez AU, Cusso R. Effect of chronic alcoholism on human muscle glycogen and glucose metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 1995 ;19:1295-1299.
95. 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:p 123–144.
96. Adams MA, Hirst M. Ethanol-induced cardiac hypertrophy: correlation between development and the excretion of adrenal catecholamines. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:33–38.

97. Adams MA, Hirst M. Lack of cardiac α_1 -adrenergic involvement in ethanol-induced cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;7:240–245.
98. Adams MA, Hirst M. Metoprolol suppresses the development of ethanol-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:562–567.
99. Molkenkin JD, Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Ann Rev Physiol* 2001;63:391–426.
100. Tamargo J. Introducción al concepto de canal iónico. Dpto de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.
101. Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1989;18:333-364.
102. Brum G, Rios E, Stefani E. Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol* 1988;398:441-473.
103. Leung AT, Imagawa T, Campbell KP. Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca^{2+} channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem* 1987;262:7943-7946.
104. Arikath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG, Campbell KP. Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem* 2003;278:1212-1219.
105. Rios E, Brum G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 1987;325:717-720.

106. Thomas AP, Sass EJ, Tun-Kirchmann TT, Rubin E. Ethanol inhibits electrically-induced calcium transients in isolated rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:555-565.
107. Guppy LJ, Crabble JC, Littleton JM. Time course and genetic variation in the regulation of calcium channel antagonist binding sites in rodent tissues during the induction of ethanol physical dependence and withdrawal. *Alcohol* 1995;30:607-615.
108. Sarma JS, Ikeda S, Fischer R, Maruyama Y, Weishaar R, Bing RJ. Biochemical and contractile properties of heart muscle after prolonged alcohol administration. *J Mol Cell Cardiol* 1976 ;8:951-972.
109. Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997;25:82-88.
110. Joris MI. Apoptosi, oncosis and necrosis. An overview of Cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
111. 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.
112. 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.
113. Thornberry NA. The caspases family of cysteine proteases. *Br. Med Bull* 1997;53:146-147.

114. 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.
115. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991;83:1849–1865.
116. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335:1182–1189.
117. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996;335:1190 –1196.
118. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996;97:2891–2897.
119. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:859–870.
120. Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997;272:14860–14866.
121. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320 –323.

122. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1506–1512.
123. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997;100:1363–1372.
124. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*. 1998; 97:276–2
125. Hajnoczky G, Buzas CJ, Pacher P, Hoek JB, Rubin E. Alcohol and mitochondria in cardiac apoptosis: mechanisms and visualization. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:693-701.
126. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875-80.
127. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52:253-265.
128. Henry TD, Archer SL, Nelson D, Weir EK, From AH. Enhanced hemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990;67:1453-1461.
129. van Jaarsveld H, Kuyl JM, van Zyl GF, Barnard HC. Salicylate in the perfusate during ischemia/reperfusion prevented mitochondrial injury. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1994;86:287-295.
130. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990;82:723-738.

131. Gupta M, Singal PK. Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy. *Circ Res* 1989;64:398-406.
132. Dhalla AK, Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 1994;266:1280-1285.
133. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL, Herb RA. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1993;265:2094-2098.
134. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 1994; 29:513-522.
135. Redetzki JE, Griswold KE, Nopajaroonsri C, Redetzki HM. Amelioration of cardiotoxic effects of alcohol by vitamin E. *J Toxicol Clin Toxicol* 1983; 20:319-331.
136. Edes I, Toszegi A, Csanady M, Bozoky B. Myocardial lipid peroxidation in rats after chronic alcohol ingestion and the effects of different antioxidants. *Cardiovasc Res* 1986;20:542-548.
137. Edes I, Piros G, Forster T, Csanady M. Alcohol-induced congestive cardiomyopathy in adult turkeys: effects on myocardial antioxidant defence systems. *Basic Res Cardiol* 1987;82:551-556.
138. Kino M. Chronic effects of ethanol under partial inhibition of catalase activity in the rat heart: light and electron microscopic observations. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:5-21.
139. Garriga J, Fernández-Solà J, Adanero E, Urbano-Marquez A, Cusso R. Metabolic effects of ethanol on primary cell cultures of rat skeletal muscle. *Alcohol* 2005;35:75-82.

140. Fernández-Solà J, Nicolás JM, Fatjó F, Garcia G, Sacanella E, Estruch R, Tobias E, Badia E, Urbano-Marquez A. Evidence of apoptosis in chronic alcoholic skeletal myopathy. *Hum Pathol* 2003;34:1247-1252.
141. Nicolás JM, Garcia G, Fatjó F, Sacanella E, Tobias E, Badia E, Estruch R, Fernández-Solà J. Influence of nutritional status on alcoholic myopathy. *Am J Clin Nutr* 2003;78:326-333.
142. Garriga J, Adanero E, Fernández-Solà J, Urbano-Márquez A, Cusso R. Ethanol inhibits skeletal muscle cell proliferation and delays its differentiation in cell culture. *Alcohol Alcohol* 2000;35:236-241.
143. Cofan M, Nicolas JM, Fernández-Solà J, Robert J, Tobias E, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Marquez A. Acute ethanol treatment decreases intracellular calcium-ion transients in mouse single skeletal muscle fibres in vitro. *Alcohol Alcohol* 2000;35:134-138.
144. Fernández-Solà J, Villegas E, Nicolàs JM, Deulofeu R, Antúnez E, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Márquez. Serum and muscle levels of alpha-tocopherol, ascorbic acid and retinol are normal in chronic alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:422-427.
145. Bjorneboe A, Bjorneboe GE. Antioxidant status and alcohol-related diseases. *Alcohol Alcohol* 1993;28:111-116.
146. Fernandez-Sola J, Estruch R, Grau JM, Pare JC, Rubin E, Urbano-Marquez A. The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1994;120:529-536.