



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nous factors implicats en la patologia cardíaca i l'obesitat

Gemma Ferrer Curriu



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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Grup de Cardiologia Molecular

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Programa de Doctorat en Biomedicina

Nous factors implicats en la patologia cardíaca i l'obesitat

Memòria presentada per

Gemma Ferrer Curriu

per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Gemma Ferrer Curriu

Firma dels directors

Dra. Anna Planavila Porta

Dr. Francesc Villarroya Gombau

Barcelona, 2020

AGRAÏMENTS

Agraïments

Aquí estic. Finalment ha arribat l'hora d'escriure els agraïments, l'única part que llegirà tothom, científics i no científics ... no passa res ... jo he fet el mateix. S'ha de reconèixer que quan algú entra per la porta del departament amb la tesi impresa, el primer que es mira és la portada i els agraïments, i després d'això es fa un cop d'ull ràpid a l'interior. Sóc conscient que ara passarà el mateix, encara que alguns de vosaltres ja heu vist la tapa, per tant, encara hi haurà més expectativa pels agraïments. Quina pressió tu!

Fa anys, quan vaig fer el màster de Biomedicina, la Marta em va donar la classe de cultius cel·lulars. En un dels treballs ens demanava descriure una tècnica de cultius cel·lular i no recordo com va anar però el vaig fer sobre el cultiu primari de cardiomiòcits. Recordo que la Marta em va posar en contacte amb una noia del seu grup que en feia, l'Anna. Vam anar al laboratori del TAM on l'Anna ens va explicar el protocol del cultiu primari de cardiomiòcits. Qui m'hagués dit que anys més tard, tornaria en aquell laboratori per treballar-hi!! Destí ... qui sap ... per mi, una gran sort!

Primer de tot donar les gràcies a l'Anna per aquesta oportunitat i per tot el què m'ha ensenyat durant aquest temps. I sobretot gràcies pel seu suport i optimisme. No hi havia res millor que fer reunió amb ella un divendres a la tarda perquè encara que no tinguessis els resultats esperats trobava la part positiva per marxar tranquil·la de cap de setmana.

També donar gràcies al Francesc i la Marta per donar-me l'oportunitat de formar part d'aquest gran grup.

Una altra part important d'aquesta tesi és la gent del laboratori. No hi ha millor manera de començar el dia que amb "*Bon dia, bonica!*" de la Merche. Els dies al laboratori tampoc haguessin estat igual sense el club del te o del cafè, en funció de si era hivern o estiu. Mare meva, amb la nova cafetera, el Dunkin ens deu trobar a faltar ... Tampoc oblidar les cerveses de la tarda ja fossin al bar de la facultat o a la pizzeria o les sessions de perruqueria al TAM3!

I és que no només és un gran grup a dins del laboratori sinó també a fora. Hem fet un munt de sortides que no oblidaré com les visites al mercat medieval de Vic, la caminada al Matagalls, les famoses calçotades (tot i que els calçots són el menys important, mentre hi hagi carn i salsa de calçots!), els dinars de Nadal, els sopar de tesi (on he descobert un munt de llocs nous per menjar a Barcelona!!!), les tardes de 'Tacos'...

A més a més, qui m'hauria dit al començar la tesis que també rodaria pel·lícules. Al poc de començar em va explicar que al laboratori hi havia la costum de gravar pel·lícules quan algú presentava la tesi. Abans d'entrar aquí havia gravat els típics vídeos amb fotos, escrits i una música emotiva de fons, però res a veure amb les PEL·LÍCULES d'aquí. Tot planejat al mil·límetre ... arguments, vestuari, guió, efectes especials ... com els professionals!!! Les dots escèniques no són lo meu, només espero haver millorat, ni que sigui una mica, amb el temps.

Agraïments

Gràcies a la colla perquè sempre us preocupàveu per com anaven els experiments i els resultats. Jo intentava explicar-vos, tot i que sóc conscient que molts cops no enteníeu ni la meitat del què us deia. Això m'ho heu deixat clar perquè de tot el què he fet només em sabeu dir: *Tallar cap a ratolins !!! I emborratxar ratolins !!!*

Gràcies a la família per estar al meu costat. I sobretot, gràcies a tu Ivan per tot el teu suport al llarg d'aquesta etapa i per la teva gran paciència!!! Al teu costat, tot és més fàcil. T'estimo.

Moltes gràcies a tothom!!!!!!

PRESENTACIÓ

PRESENTACIÓ

La present tesi doctoral s'organitza segons la normativa vigent pel què fa al format de tesi com a compendi de publicacions establert per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

1. Sinopsi
2. Índex
3. Llistat d'abreviatures
4. Introducció general
5. Objectius
6. Informe dels codirectors de tesi sobre els articles publicats
7. Publicacions:
 - Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease
 - The protective effect of fibroblast growth factor-21 in alcoholic cardiomyopathy: is there a role on mitochondrial dysfunction?
 - Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery
8. Discussió global dels resultats
9. Conclusions
10. Bibliografia
11. Apèndix:
 - Decreased myocardial titin expression in chronic alcoholic cardiomyopathy

SINOPSI

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of mortality in industrialized countries and are caused by genetic factors, environmental factors or comorbidities. This thesis is focused on three cardiovascular risk factors such as hypertension, alcoholism and obesity. These pathologies are mainly characterized by hypertrophy and cardiac fibrosis.

In recent last years, cardiomyokines have been described as cardioprotective factors against pathological stimuli. One of the most important cardiomyokines is Fibroblast growth factor 21 (FGF21). FGF21 is released by the heart under cardiac stress situations where acts in a autocrine or paracrine manner protecting cardiomyocytes against inflammation, oxidative stress and apoptosis. FGF21 has been described as a protective factor against cardiac hypertrophy, atherosclerosis, ischemia and other cardiac pathologies.

In the first part this thesis has studied the role of FGF21 in hypertensive and alcoholic cardiomyopathy.

It has been identified that FGF21 gene expression in heart and its circulating levels are induced in response to hypertension, and that FGF21 acts at cardiac level protecting against cardiac fibrosis. Its protective effect has been confirmed in newborn animals treated with FGF21 where cardiac fibrosis was reversed. Moreover, this protective effect on cardiac fibrosis is due to a direct effect of FGF21 on cardiac fibroblasts.

It has also been identified that FGF21 gene expression in heart and its circulating levels are induced in response to chronic alcohol consumption. In contrast, lack of FGF21 altered cardiac metabolism, oxidative stress and mitochondrial damage in animals subjected to chronic alcohol consumption. In addition, a positive correlation between myocardial FGF21 levels and oxidative stress have been found in alcoholic patients suggesting a role of FGF21 in the activation of antioxidant defenses during alcoholic cardiomyopathy.

On the other hand, this thesis has evaluated two proteins involved in the regulation of energy expenditure through brown adipose tissue (BAT). BAT is the main energy-consuming tissue in mammals. It is considered that BAT may play a role in protecting against obesity. Metrnl is a metabolic regulator that promotes TAM activation while Oncostatin M (OSM) inhibits it.

In the last part of this thesis we have studied the role of Metrnl and OSM in obese patients undergoing bariatric surgery. Metrnl circulating levels increase progressively after bariatric surgery while OSM levels decrease in obesity patients undergoing bariatric surgery. This suggests that bariatric surgery modulates circulating levels of these two proteins in an opposite manner in order to activate BAT and promote energy expenditure in these obese patients.

In summary, FGF21 appears to play an important role in the protection of cardiac fibrosis induced by hypertensive cardiomyopathy. In addition, FGF21 also appears to play an important role in activating antioxidant defenses during alcoholic cardiomyopathy. Lastly, Metrnl and OSM could be regulated during bariatric surgery to promote energy expenditure activation and protect against obesity.

ÍNDEX

Presentació.....	7
Sinopsi	11
Índex.....	15
Abreviatures	21
Introducció general	25
1. Malalties cardiovasculars.....	27
2. Hipertrofia cardíaca	28
2.1 Tipus d'hipertrofia	29
2.2 Marcadors d'hipertrofia cardíaca	29
2.3 Metabolisme cardíac.....	33
2.3.1 Metabolisme energètic	33
2.3.2 Regulació mitocondrial.....	34
2.4 Resposta hipertrofica	35
2.4.1 Estímuls desencadenants de la hipertrofia	35
2.4.2 Vies de senyalització implicades en la hipertrofia	36
3. Fibrosi cardíaca.....	39
3.1 Tipus de fibrosi.....	39
3.2 Fibroblasts cardíacs	40
3.3 Transició de fibroblast a miofibroblast	40
3.4 Matriu extracel·lular.....	42
4. Factors de risc cardiovascular	44
4.1 Hipertensió.....	44
4.1.1 Factors implicats en el remodelat cardíac	44
4.1.1.1 Hipertrofia.....	45
4.1.1.2 Estrès oxidatiu.....	45
4.1.1.3 Inflamació.....	46
4.1.1.4 Apoptosi	47
4.1.1.5 Microvasculatura coronària	47
4.1.1.6 Fibrosi	47
4.1.2 Tractament	48
4.2 Alcoholisme	50

4.2.1	Metabolisme de l'alcohol al cor	51
4.2.2	Factors implicats en el remodelat cardíac	52
4.2.2.1	Estrès oxidatiu	52
4.2.2.2	Dany mitocondrial	53
4.2.2.3	Canvis en el transport i metabolisme d'àcids grassos	55
4.2.2.4	Apoptosis	55
4.2.3	Tractament.....	56
4.3	Obesitat.....	57
4.3.1	Tipus de teixit adipós	57
4.3.2	Distribució del teixit adipós en humans.....	58
4.3.3	Tipus d'obesitat en humans.....	59
4.3.4	Disfunció del teixit adipós blanc durant l'obesitat	60
4.3.5	Disfunció cardíaca durant l'obesitat	62
4.3.6	Tractaments	63
5.	Fibroblast growth factors	68
5.1	Família dels FGFs.....	68
5.1.1	Classificació funcional FGFs.....	68
5.1.2	Característiques estructurals dels FGFs	70
5.1.3	Senyalització cel·lular dels FGFs.....	70
5.1.3.1	Receptors dels FGFs.....	70
5.1.3.2	Interacció amb l'heparan sulfat.....	72
5.1.3.3	Cofactors Klotho	72
5.1.3.4	Dimerització del receptor i mecanisme d'acció	73
5.2	FGFs endocrins.....	74
5.2.1	FGF21	74
5.2.1.1	Efectes fisiològics de FGF21 en els teixits.....	75
5.2.1.1.1	FGF21 en el fetge	75
5.2.1.1.2	FGF21 en el teixit adipós blanc	76
5.2.1.1.3	FGF21 en el teixit adipós marró	76
5.2.1.1.4	FGF21 en el múscul	77
5.2.1.1.5	FGF21 en el pàncrees	77
5.2.1.1.6	FGF21 en el sistema nerviós central	77

5.2.1.1.7	FGF21 en el cor	79
5.2.1.2	FGF21 en humans	82
6.	Meteorin-like (Metrn1).....	85
6.1	Efectes fisiològics de Metrn1 en els teixits	85
6.1.1	Metrn1 en el cervell	85
6.1.2	Metrn1 en el sistema immunitari.....	85
6.1.3	Metrn1 en el teixit adipós	86
6.1.4	Metrn1 en múscul	87
6.1.5	Metrn1 en humans.....	87
7.	Oncostatina m (OSM).....	89
7.1	Estructura	89
7.2	Receptors.....	89
7.3	Senyalització cel·lular	90
7.4	Efectes fisiològics de l'OSM en els teixits.....	91
7.4.1	OSM en el teixit adipós	91
7.4.2	OSM al fetge	93
8.	Objectius	95
9.	Informe dels codirectors de tesi	99
10.	Publicacions.....	103
	Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease	105
	The protective effect of Fibroblast growth factor 21 in alcoholic cardiomyopathy: is there a role on mitochondrial dysfunction?	121
	Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery	153
11.	Discussió global dels resultats.....	163
12.	Conclusions.....	173
13.	Bibliografia	177
14.	Apèndix.....	205
	Decreased myocardial titin expression in chronic alcoholic cardiomyopathy.....	207

ABREVIATURES

ABREVIATURES

A continuació es mostra una relació, per ordre alfabètic, de les principals abreviatures i sigles emprades en la memòria de la present tesi doctoral. Aquestes i altres abreviatures menys freqüents es troben detallades en el text.

3-NT	3-nitrotirosina	JNK	<i>c-jun amino-terminal kinase</i>
4-HNA	4-hidroxinonenal	KLB	<i>β-Klotho</i>
AFL	<i>alcoholic fatty liver</i> ; fetge gras associat a l'alcohol	LIF	<i>leukemia inhibitor factor</i>
ANF	<i>atrial natriuretic factor</i>	LIFR	receptor de LIF
Ang II	angiotensina II	LSG	gastrectomia laparoscòpica de màniga
AT1	receptor de l'angiotensina 1	LVIDd	diàmetre intern del ventricle esquerre en repòs
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	LVIDs	diàmetre intern del ventricle esquerre durant la contracció
BNF	brain natriuretic factor	LVPWd	paret posterior del ventricle esquerre en repòs
BW	<i>body weight</i> ; pes corporal	LVPWs	paret posterior del ventricle esquerre durant la contracció
CD36	<i>cluster of differentiation o fatty acid translocase</i>	MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
CPT1β	<i>carnitine palmitoyltransferase 1 β</i>	MCAD	<i>medium chain acilCoA dehydrogenase</i>
DNAmt	DNA mitocondrial	MDA	malonaldehid
EDV	volum de la cavitat al final del repòs	MEC	matriu extracel·lular
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>	Metrn	<i>meteorin</i>
ERR	<i>estrogen-related receptor</i>	Metrn1	<i>meteorin like</i>
ESV	volum de la cavitat al final de la contracció	MMP	metalopectidases de la matriu
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	NAFLD	<i>non alcoholic fatty liver disease</i> ; fetge gras no alcohòlic
FGF21	<i>fibroblast growth factor 21</i>	NASH	<i>non alcoholic steatohepatitis</i> ; esteatohepatitis no alcohòlica
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>	NRF2	<i>nuclear respiratory factor</i>
Gp130	glicoproteïna 130	OSM	oncostatina M
GPCR	receptor acoblat a proteïna G	OSMR	receptor de l'oncostatina M
GPx	glutatió peroxidasa	PDK4	<i>pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4</i>
HFD	<i>high fat diet</i> ; dieta rica en greixos	PGC-1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>
HS	<i>heparan sulfat</i>	PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
HW	<i>heart weight</i> ; pes del cor	PK	<i>protein kinase</i>
IMC	índex de massa corporal	PLC	<i>phospholipase C</i>
ISO	isoproteranol		
IVSd	septe interventricular en repòs		
IVSs	septe interventricular durant la contracció		
JAK	<i>janus kinase</i>		

Abreviatures

PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
ROS	espècies reactives d'oxigen
RWT	gruix de la paret relatiu
SNC	sistema nerviós central
SOD	superòxid dismutasa
TAA	teixit adipós abdominal
TAB	teixit adipós blanc
TAE	teixit adipós epicàrdic
TAM	teixit adipós marró
TAP	teixit adipós pericàrdic
TAS	teixit adipós subcutani
TAV	teixit adipós visceral
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TIMP	inhibidors tissulars de les metalopeptidases
TL	<i>tibial lenght</i> ; mesura de la tíbia
UCP	<i>uncoupling protein</i>
WT	<i>wild type</i>
α-MHC	<i>alpha myosin heavy chain</i>
α-SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
β-MHC	<i>beta myosin heavy chain</i>

INTRODUCCIÓ GENERAL

1. MALALTIES CARDIOVASCULARS

Les malalties cardiovasculars engloben el grup de patologies que presenten afectacions cardíques o a nivell dels vasos sanguinis. Segons l'Organització Mundial de la Salut, l'any 2016 van provocar 17.9 milions de morts i estan considerades la primera causa de mortalitat a nivell mundial.

Es poden classificar en diversos grups segons la zona afectada i la seva patologia:

- **Cardiopatia coronària:** és la patologia més habitual. Consisteix en l'obstrucció de les artèries degut a la formació de plaques arterioscleròtiques, provocant que el cor no rebi suficient sang i oxigen pel seu correcte funcionament. És la causa més freqüent de la mort sobtada o la mort cardiovascular entre la població.
- **Malaltia cerebrovascular:** consisteix en alteracions als vasos sanguinis que porten la sang al cervell provocant una disminució del flux sanguini cerebral i com a conseqüència alteracions en el correcte funcionament del cervell. Pot anar associada a processos isquèemics o hemorràgics, i en funció de la seva gravetat pot acabar provocant danys neurològics.
- **Arteriopatia perifèrica:** consisteix en una obstrucció del vasos sanguinis que porten la sang a les extremitats generalment deguda a la formació de plaques arterioscleròtiques fent que el flux sanguini de les extremitats es redueixi. Si l'obstrucció del flux sanguini és molt greu pot acabar amb l'amputació de les extremitats afectades.
- **Cardiopatia reumàtica:** consisteix en lesions al miocardi i a les vàlvules cardíques produïdes per la febre reumàtica. La febre reumàtica és una complicació de la infecció amb estreptococ al coll o a les amígdales que no s'ha curat adequadament.
- **Cardiopatia congènita:** consisteix en el conjunt d'alteracions cardíques i dels vasos sanguinis que s'originen abans del naixement. Són conseqüència d'un mal desenvolupament cardíac durant l'embaràs.
- **Embòlia pulmonar:** consisteix en el bloqueig de l'artèria pulmonar. Sol estar causada per un coàgul de sang que es desprèn i viatja per la circulació sanguínia fins al pulmó provocant danys en els pulmons, una disminució dels nivells d'oxigen en la sang o bé alteracions en altres òrgans per manca d'oxigen.

Les malalties cardiovasculars estan causades per la combinació de diferents factors com són alteracions genètiques, diversos factors ambientals o la presència d'altres patologies. Al llarg d'aquesta tesi ens centrarem en tres factors de risc cardiovascular: la hipertensió, l'alcoholisme i l'obesitat així com en les seves principals afectacions a nivell cardíac i els processos d'hipertròfia i fibrosis cardíaca.

2. HIPERTRÒFIA CARDÍACA

El cor és un òrgan vital per l'organisme ja que s'encarrega de bombejar la sang per tot el sistema circulatori fent arribar l'oxigen i els nutrients a la resta d'òrgans, i retornant el diòxid de carboni als pulmons (Figura 1). Al llarg de la vida, l'organisme està sotmès a diferents situacions que modificaran la demanda d'oxigen i nutrients dels teixits i, el cor està preparat per adaptar-se i satisfer la demanda en cada situació (Toumainen and Tavi, 2017).

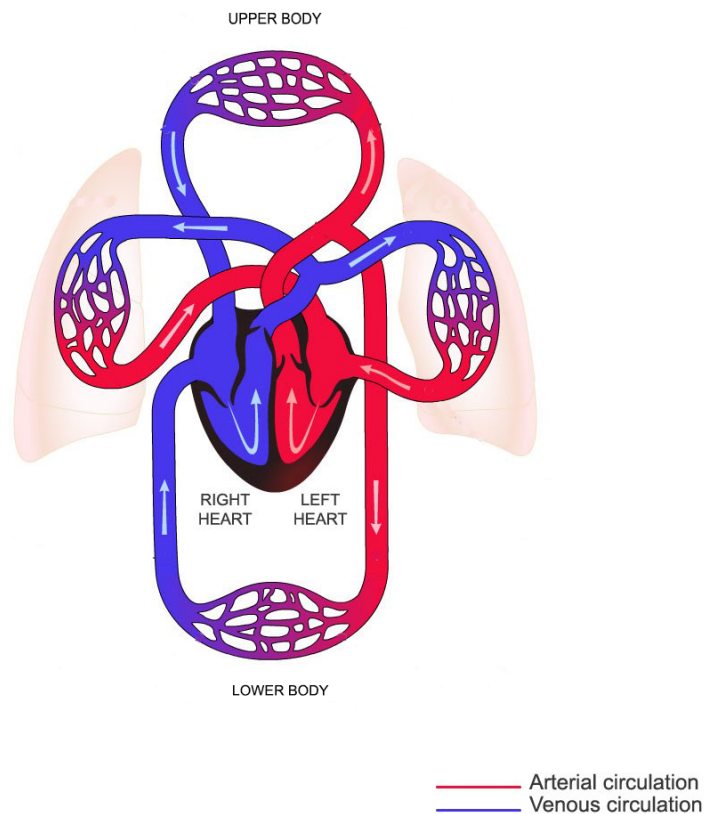


Figura 1. Esquema de la funció del sistema cardiovascular.

En situacions on el cor està sotmès a una sobrecàrrega de treball sostinguda en el temps, les parets del cor presenten una gran pressió i es produeix un augment de la mida i la massa de les cèl·lules cardíaques. Aquest procés s'anomena hipertròfia cardíaca i és una resposta adaptativa per millorar el rendiment i disminuir la pressió sobre les parets del cor (Berenji et al., 2005; Cooper, 1987). El procés d'hipertròfia pot ser adaptatiu i beneficiós (hipertròfia fisiològica) o perjudicial en resposta a una sobrecàrrega de pressió o volum sobre les parets del cor (hipertròfia patològica) (Eghbali et al., 2005). Aquests dos tipus d'hipertròfia estan induïdes per estímuls diferents i també desencadenen respostes diferents a nivell cel·lular. Al llarg d'aquesta tesi només ens centrarem amb la hipertròfia patològica ja que és la que es desenvolupa en els nostres models d'estudi.

La hipertròfia patològica es produeix en resposta a la hipertensió, l'alcoholisme, l'obesitat, la malaltia valvular i l'infart de miocardi. La hipertròfia sol anar associada a fibrosis, mort cel·lular, disfunció cardíaca i un major risc d'insuficiència cardíaca (Cohn et al., 1997; Levy et al., 1990;

Weber et al., 1993). Si l'estrès sobre les parets del cor hipertrofiat es manté, el cor es dilatarà provocant problemes en la contracció muscular i, finalment entrarà en insuficiència cardíaca (Bernardo et al., 2010). La insuficiència cardíaca es considera una de les causes de mort més freqüents en les societats desenvolupades. Actualment no té cura i la probabilitat de supervivència a llarg termini és molt baixa (Bleumink et al., 2004). Això ha promogut que diversos estudis es centrin en buscar els mecanismes moleculars implicats en la transició entre la hipertròfia i la insuficiència cardíaca per buscar noves dianes terapèutiques i evitar aquesta transició (Bernardo et al., 2010).

2.1 TIPUS D'HIPERTRÒFIA

La hipertròfia cardíaca es pot classificar segons la geometria del cor que ve determinada pel tipus d'estímul que la desencadena (Figura 2):

- **Concèntrica:** es caracteritza per un augment del gruix de la paret del ventricle, un augment en la massa del cor i una petita reducció o no de la cavitat del ventricle. És conseqüència d'un augment en l'amplada dels cardiomiòcits i es sol desencadenar per sobrecàrrega de pressió.
- **Excèntrica:** es caracteritza per un augment en la massa del cor i en el volum de la cavitat del ventricle. El gruix de la paret del ventricle pot mantenir-se igual, augmentar o bé disminuir. És conseqüència d'un augment en la llargada dels cardiomiòcits i es sol desencadenar per sobrecàrrega de volum (Grossman et al., 1975).

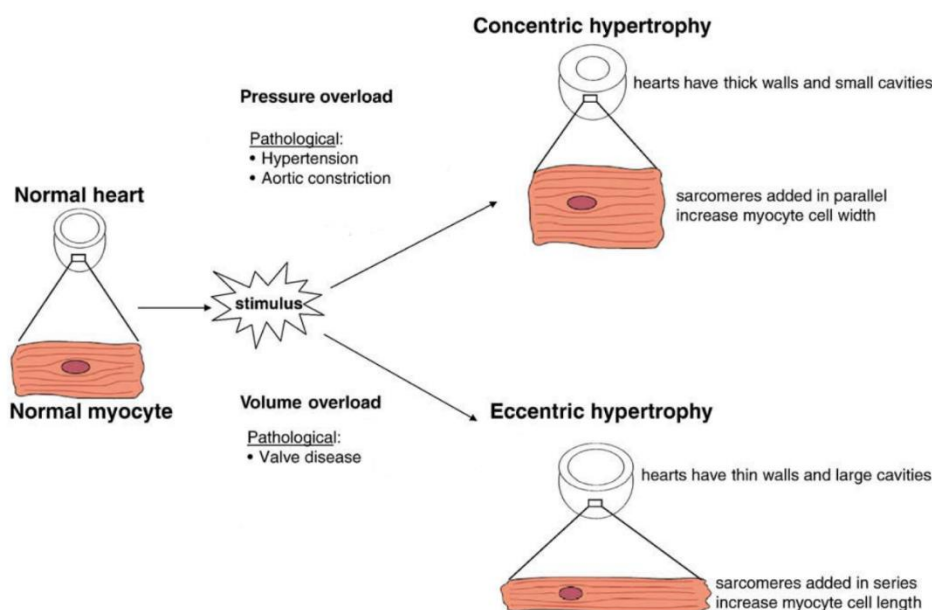


Figura 2. Representació dels tipus d'hipertròfia cardíaca en funció de la geometria del cor (imatge adaptada de Bernardo et al., 2010).

2.2 MARCADORS D'HIPERTRÒFIA CARDÍACA

És molt important conèixer les eines per identificar la hipertròfia cardíaca en models experimentals de rosegadors. En primer lloc, el pes del cor (HW: *heart weight*) ens permet saber si hi ha hagut un increment en la massa del cor o no. Clàssicament, aquesta dada s'ha normalitzat amb el pes corporal (BW: *body weight*) però s'ha vist que aquest varia amb l'edat, per tant,

actualment s'utilitza la mida de la tibia (TL: *tibia length*) ja que és un paràmetre constant i que no varia amb l'edat un cop ha finalitzat el creixement. Un increment en la relació HW/TL és indicatiu d'hipertròfia cardíaca (Yin et al., 1982).

Una altre manera de determinar el grau d'hipertròfia i la funció cardíaca és a través de les ecocardiografies, una tècnica no invasiva. Generalment, s'avaluen els paràmetres del ventricle esquerre ja que aquest presenta una gran càrrega de treball i és on es manifesten primer les alteracions cardíques. Les ecocardiografies ens permeten avaluar paràmetres estructurals (gruix de les parets del ventricle esquerre, del septe o el diàmetre de la cavitat interior), paràmetres de disfunció cardíaca o capacitat contràctil i paràmetres de geometria indicant si es tracta d'una hipertròfia concèntrica o excèntrica (Taula 1). Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la hipertròfia patològica es pot detectar per un augment en el gruix de les parets del ventricle o un augment en la seva cavitat.

Paràmetres	
Estructurals	LVPWd: paret posterior del ventricle esquerre en repòs LVPWs: paret posterior del ventricle esquerre durant la contracció LVIDd: diàmetre intern del ventricle esquerre en repòs LVIDs: diàmetre intern del ventricle esquerre durant la contracció IVSd: septe interventricular en repòs IVSs: septe interventricular durant la contracció
Disfunció cardíaca	EDV: volum de la cavitat al final del repòs ESV: volum de la cavitat al final de la contracció
Geomètrics	RWT: gruix de la paret relatiu

Taula 1. Principals paràmetres analitzats en les ecocardiografies per avaluar la hipertròfia cardíaca.

Finalment, aquestes dades es confirmen amb l'expressió gènica de diversos marcadors d'hipertròfia cardíaca en el ventricle esquerre. Els principals marcadors d'hipertròfia són:

- **Proteïnes contràctils**

Aquests marcadors inclouen proteïnes implicades en l'activitat contràctil com les miosines cardíques (α i β -MHC: *α i β myosin heavy chain*) o proteïnes implicades en el transport intracel·lular de Ca^{2+} . En la hipertròfia cardíaca patològica, es produeix un augment en l'expressió de la β -MHC en detriment de la α -MHC (Samak et al., 2016). A més a més, també hi ha una disminució de la proteïna SERCA2a (*sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a*) (Rupp, 1981).

La α -MHC és una proteïna sarcomèrica que s'expressa majoritàriament en les aurícules del cor adult (Posch et al., 2010). En canvi, la β -MHC és una proteïna que s'expressa en les fibres del múscul esquelètic i en el ventricle durant l'etapa fetal. Aquestes proteïnes s'han relacionat amb patologies cardíques com la insuficiència cardíaca on en la majoria de casos es produeix un augment de la isoforma β i una disminució de la isoforma α característica dels cors adults (Barry et al., 2008) aquest canvi coincideix amb el canvi de patró d'expressió gènica que es dona en la hipertròfia cardíaca patològica on es tornen a expressar gens fetals (Samak et al., 2016).

La proteïna SERCA2a és una proteïna clau per a la relaxació del múscul cardíac. Consta d'una Ca^{2+} ATP_{asa} que transfereix Ca^{2+} del citosol a l'interior del reticle sarcoplasmàtic gastant una molècula d'ATP durant la relaxació muscular (Shareef et al., 2014). Durant el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca els nivells d'expressió d'aquesta proteïna es redueixen (Rupp, 1981).

- **Pèptids natriurètics**

La hipertròfia cardíaca patològica produeix un canvi en el patró d'expressió gènica fent que es tornin a expressar gens fetals i, afectant l'expressió dels pèptids natriurètics (ANF: *Atrial natriuretic factor*, BNF: *Brain natriuretic factor*). En aquesta situació, els pèptids natriurètics es troben augmentats i serveixen com a bon marcador d'hipertròfia cardíaca (Samak et al., 2016).

L'ANF es sintetitza tant en les aurícules com en els ventricles mentre que el BNF es sintetitza principalment en els ventricles (Edwards et al., 1988). Es troben molt expressats durant el desenvolupament embrionari però menys en cors adults sans (Barry et al., 2008). S'encarreguen d'inhibir la funció de la renina, la vasopressina i l'aldosterona que regulen el volum extracel·lular. (Savoia et al., 2010). Tant l'ANF com el BNF són secretats pel cor en condicions d'estrès per tal de disminuir la pressió i augmentar el volum sanguini. Ambdós es troben augmentats en les malalties cardiovasculars (Harvey and Leinwand, 2011) i també serveixen com a indicadors d'insuficiència cardíaca i de la seva severitat (Moertl et al., 2009).

- **Proteïnes implicades en el metabolisme cardíac**

Un altre canvi indicatiu d'hipertròfia es troba a nivell del metabolisme cardíac. En una situació normal, el 60-70% de l'ATP (*adenosine triphosphate*) generat al miocardi prové de l'oxidació d'àcids grassos i el 30-40% restant prové de la glucosa o el lactat. El cor és capaç de canviar de substrat energètic per adaptar-se a les concentracions de substrat presents en la sang en cada situació (dejuni, obesitat, exercici, etc). D'aquesta manera el cor sempre pot fer front a l'alta demanda energètica que requereix (Van der Vusse et al., 1992). Per contra, en una situació d'hipertròfia patològica el cor disminueix l'oxidació d'àcids grassos i augmenta la utilització de la glucosa tal i com passa en l'estat fetal. Per tant, la inducció de gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa o la disminució de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos en els cardiomiòcits, també és un bon indicatiu d'hipertròfia cardíaca patològica.

En la taula 2 trobem recollides les principals característiques de la hipertròfia cardíaca patològica.

Característica	Hipertròfia cardíaca Patològica
Estímul	Malaltia Augment de la pressió o volum en el cor Cardiomiopatia
Morfologia	Augment en la mida dels cardiomiòcits Formació de nous sarcòmers Augment en la mida del cor
Fibrosis	Sí
Apoptosis	Sí
Expressió de gens fetals	Augment de l'expressió de ANF, BNP, β -MHC i α -actinina
Expressió de gens relacionats amb la funció contràctil	Reducció de l'expressió de SERCA2a i α -MHC
Funció cardíaca	Reduïda
Metabolisme	Reducció de l'oxidació d'àcids grassos Augment de l'oxidació de glucosa
Reversibilitat	No
Associació amb insuficiència cardíaca i mortalitat	Sí

Taula 2. Resum de les principals característiques de la hipertròfia cardíaca patològica (Taula adaptada de Bernardo et al., 2010).

2.3 METABOLISME CARDÍAC

2.3.1 METABOLISME ENERGÈTIC

El cor adult pot utilitzar diversos substrats per obtenir energia com àcids grassos, glucosa, lactat, aminoàcids o cossos cetònics, fet que li dona la plasticitat necessària per garantir la despesa energètica en diferents situacions (Toumainen and Tavi, 2017). En condicions fisiològiques, el cor utilitzarà principalment àcids grassos, que són transportats als mitocondris on té lloc la β -oxidació i es forma l'acetil CoA. Posteriorment, aquest acetil CoA entra en el cicle de Krebs on produeix el CO_2 i les molècules de NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide*) i FADH (*Flavin adenin dinucleotide*) necessàries per obtenir ATP a través de la cadena respiratòria mitocondrial. Pel què fa a la glucosa, tot i tenir una aportació molt menor, una part es transforma en acetil CoA i farà el mateix procés que els àcids grassos mentre que l'altra part obté energia directament de la glucòlisi (Figura 3) (Jafri et al., 2001; Stanley et al., 2005). Si la glucosa s'oxida totalment genera més de 30 molècules d'ATP per molècula de glucosa, mentre que la glucòlisi només permet la formació de 2 molècules d'ATP (Kolwicz et al., 2013).

Per altra banda, en una situació d'hipertròfia cardíaca, el cor disminueix l'oxidació d'àcids grassos i augmenta la utilització de la glucosa, tal i com passa en l'etapa fetal on l'oxidació d'àcids grassos només representa un 15% del total de la producció d'ATP (Lopaschuk et al., 1991). El canvi a la utilització de glucosa permet obtenir un major rendiment d'ATP per cada molècula d'oxigen consumit (Van Bilsen et al., 2009). Tot i això, el metabolisme glucídic fa que el teixit cardíac es torni més tolerant a la isquèmia i que es produeixi una acumulació d'ions a nivell citosòlic. Per contrarestar aquesta situació, la despesa energètica destinada a les bombes protòniques augmenta fent que es destini menys energia a la contracció cardíaca i, per tant, disminueixi l'eficiència energètica (Figura 3). Malgrat tot, encara no està clar si el canvi de metabolisme és una causa o una conseqüència de la hipertròfia cardíaca. El què està molt establert és que en estats avançats de la patologia, el cor no és capaç d'utilitzar la glucosa com a substrat i entra en insuficiència cardíaca (Figura 4) (Neubauer, 2007).

La majoria de malalties cardiovasculars estan associades a problemes en el metabolisme energètic que empitjoren la progressió de la malaltia (Toumainen and Tavi, 2017). Els canvis metabòlics varien en funció del tipus de patologia cardíaca. Mentre que en la hipertròfia i la isquèmia cardíaca hi ha una disminució del metabolisme oxidatiu, en la cardiomiopatia diabètica hi ha un augment de l'oxidació d'àcids grassos per contrarestar el seu augment a nivell circulant (Fillmore et al., 2014).

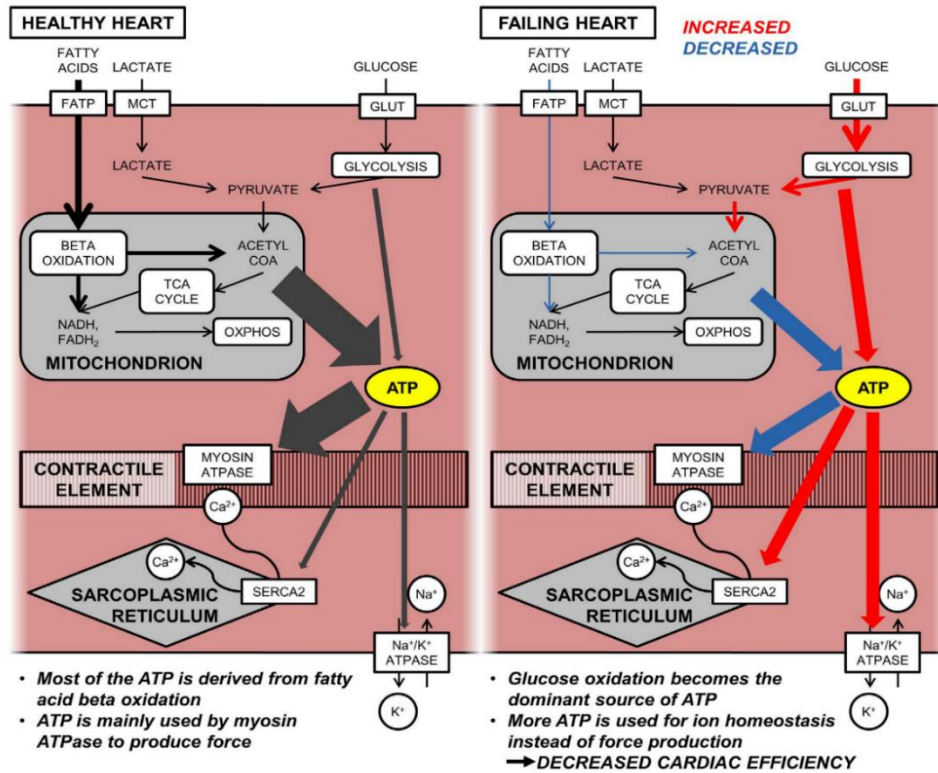


Figura 3. Procés d'obtenció d'energia al cor en una situació fisiològica o d'hipertròfia cardíaca. En una situació fisiològica, el cor obté gran part de l'energia de la β -oxidació dels àcids grassos i l'inverteix en la contracció cardíaca. Per contra, en una situació d'hipertròfia l'energia s'obté principalment a través de la glucosa generant una situació d'ineficiència cardíaca (Toumainen and Tavi, 2017).

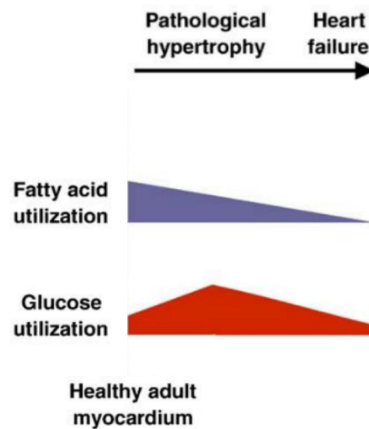


Figura 4. Patró d'utilització dels substrats energètics durant la hipertròfia i la progressió de la malaltia cardiovascular a insuficiència cardíaca (imatge adaptada de Bernardo et al., 2010).

2.3.2 REGULACIÓ MITOCONDRIAL

La progressió de les malalties cardiovasculars va associada a una disminució dels components de la fosforilació oxidativa mitocondrial i a una disminució gradual de la biogènesis mitocondrial.

En condicions fisiològiques els mitocondris ocupen el 30% del volum dels cardiomiòcits i el cor obté la major part de la seva energia de la β -oxidació mitocondrial (Kolwicz et al., 2013). El

principal regulador del metabolisme mitocondrial a nivell cardíac és PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 alpha*). Aquest regulador, a la vegada controla altres factors de transcripció importants com PPAR α (*Peroxisome proliferator-activated receptors*) que regula l'expressió de gens implicats en l'oxidació lipídica, ERR α (*Estrogen-related receptors*) i NRF2 (*Nuclear respiratory factor*) que regulen gens implicats en la cadena respiratòria mitocondrial (Puigserver and Spiegelman, 2003). Estudis en animals han demostrat que la sobreexpressió de PGC1 α a nivell cardíac augmenta la biogènesis mitocondrial, la respiració cel·lular, la β -oxidació i l'expressió de gens involucrats en la fosforilació oxidativa (Russell et al., 2004). Per contra, la manca de PGC1 α disminueix les reserves energètiques del cor així com el ritme cardíac i la contractilitat en situacions de sobrecàrrega cardíaca (Arany et al., 2006; Leone et al., 2005). De la mateixa manera, la manca de PPAR α i ERR α també provoca alteracions metabòliques associades a la presència d'hipertròfia cardíaca (Fan and Evans, 2015). PPAR α s'activa a través de la seva unió a àcids grassos i promou l'expressió de gens encarregats de la captació de lípids com CD36 (*Cluster of differentiation o fatty acid translocase*), del transport dels àcids grassos a l'interior dels mitocondris com CPT1B (*Carnitine palmitoyltransferase 1B*) i de la β -oxidació com MCAD (*Medium chain acil CoA-deshydrogenase*). A més a més, PPAR α també regula PDK4 (*Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4*) que controla el metabolisme oxidatiu de la glucosa i els àcids grassos. En una situació d'hipertròfia cardíaca patològica, on es produeix el canvi a metabolisme glucídic, tots aquests paràmetres es troben disminuïts (Planavila et al., 2006).

Finalment, es creu que la disminució dels components mitocondrials és el factor que connecta la disminució de la contractilitat i els canvis metabòlics al llarg de la insuficiència cardíaca. Això és degut a que els mitocondris a part de generar energia, també s'encarreguen de modular l'expressió de gens nuclears i vies de mort o de supervivència cel·lular (Kolwicz et al., 2013; Toumainen and Tavi, 2017).

2.4 RESPOSTA HIPERTRÒFICA

2.4.1 ESTÍMULS DESENCADENANTS DE LA HIPERTRÒFIA

La resposta hipertròfica s'activa per l'estrès mecànic o per factors neurohumorals (Ritter and Neyses, 2003).

- **Estrès mecànic**

En una situació de sobrecàrrega de treball, els cardiomiòcits detecten la deformació o la pressió sobre ells mateixos a través d'unes proteïnes mecanosensores que s'encarreguen de convertir l'estímul mecànic que pateix el cor en senyals bioquímiques. Aquestes proteïnes mecanosensores (titina, N-cadherina, integrina, vinculina, caveolina-3, etc) es situen a la membrana plasmàtica, en complexos d'adhesions focals o dins de la cèl·lula al llarg dels discs Z dels sarcòmers i activen les vies de senyalització que inicien la resposta hipertròfica (Heineke and Molkentin, 2006; Hunter and Chien, 1999; Maillet et al., 2013; Shimizu and Minamino, 2016).

- **Factors neurohumorals**

En una situació de sobrecàrrega de treball, el cor allibera factors humorals com catecolamines, Ang II (Angiotensina II) o ET-1 (Endotelina 1) que actuen de forma paracrina o autocrina (Hunter and Chien, 1999). Seguidament, aquests factors s'uneixen als receptors acoblats a proteïna G (GPCR) dels cardiomiòcits i activen la resposta hipertròfica (Bernardo et al., 2010; Shimizu and Minamino, 2016).

2.4.2 VIES DE SENYALITZACIÓ IMPLICADES EN LA HIPERTRÒFIA

Tal i com s'acaba de veure, l'estrès mecànic i els factors neurohumorals activen els receptors encarregats d'iniciar la hipertròfia. L'activació de les vies de senyalització intracel·lulars provoca canvis a nivell d'expressió gènica i proteica donant lloc a la resposta hipertròfica que es basa en un augment de la mida dels cardiomiòcits, la reactivació dels gens fetals i la formació o reorganització dels sarcòmers (Samak et al., 2016).

El procés hipertròfic engloba un gran nombre de vies de senyalització que s'intercomuniquen entre elles, de manera que els mecanismes implicats en la hipertròfia són molt complexes i, encara no es coneixen totalment.

Les principals vies de senyalització implicades en el desenvolupament de la hipertròfia són (Figura 5):

- **Receptors acoblats a proteïnes G (GPCR)**

Les proteïnes G associades als GPCR es poden dividir en dos subgrups: les proteïnes G heterodimèriques i les proteïnes G monomèriques (o GTPases).

- **Proteïnes G heterodimèriques:** estan compostes per tres subunitats (α , β i γ) que es troben unides al receptor. En resposta a un estímul patològic, el cor allibera diferents factors (Ang II, ET-1 o noradrenalina) per iniciar el procés hipertròfic. Aquests factors s'uneixen als seus respectius GPCR (Ang II receptor tipus 1 (receptor AT1), receptor d'endotelina-1 i els receptors adrenèrgics α_1 (AR)) provocant la dissociació de les subunitats de la proteïna G, en la subunitat α i la subunitat $\beta\gamma$. Seguidament, la subunitat α activa uns segons missatgers encarregats de la senyalització intracel·lular com la PLC (*Phospholipase C*), MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), PKC (*Protein kinase C*) i la PKA (*Protein kinase A*) (Gutkind, 1998a, 1998b).

- **Proteïnes G monomèriques o GTPases:** es poden dividir en 5 subfamílies (Ras, Rho (*Rhodopsin*), *ADP ribosylation factors*, Rab i Ran). L'Ang II, l'ET-1, la fenilefrina (PE) i l'estrès mecànic activen els seus corresponents GPCR que seguidament, activen Ras i Rho desencadenant la resposta hipertròfica a través d'altres molècules de senyalització cel·lular (Clerk and Sugden, 2000).

A continuació, s'explicaran les vies de senyalització que actuen com a segons missatgers en l'activació dels receptors acoblats a proteïna G.

- **PI3K (p110 γ) (Phosphoinositide 3-kinase)**

PI3K (p110 γ) actua com a regulador negatiu de la contractilitat cardíaca (Crackower et al., 2002) i també pot afavorir la hipertròfia en resposta a determinats estímuls patològics (Oudit et al., 2003). El paper de PI3K en la patologia cardíaca varia en funció del tipus d'estímul que la desencadena. Estudis amb animals d'experimentació han demostrat que PI3K promou la progressió a insuficiència cardíaca en un model d'activació crònica dels β -AR (Oudit et al., 2003) mentre que protegeix del dany cardíac en un model de sobrecàrrega crònica de pressió (Patrucco et al., 2004).

- **MAPK**

Es divideix en 3 subfamílies en funció de la quinasa final de la via: ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*c-jun amino-terminal kinase*) i p-38-MAPK. Aquestes vies s'activen en resposta als receptors AT1, AR i per l'estrès mecànic (Clerk and Sugden, 1999). També s'ha detectat l'activació d'aquestes vies en pacients amb insuficiència cardíaca (Cook et al., 1999). Malgrat tot, el paper de la MAPK encara no està del tot definit.

- **ERK 1/2:** és una proteïna quinasa que actua fosforil·lant diferents substrats citosòlics i nuclears. Es troba activada en models d'hipertròfia i insuficiència cardíaca (Bernardo et al., 2010). Estudis previs suggereixen que la seva activació és suficient per induir hipertròfia però no indispensable (Bueno et al., 2000; Harris et al., 2004). Malgrat les dades anteriors, els estudis *in vivo* en models de pèrdua de funció han mostrat resultats contradictoris fent que sigui difícil d'interpretar el seu paper *in vivo* (Purcell et al., 2007).

- **JNK:** JNK s'ha trobat activada en cors de pacients amb insuficiència cardíaca (Cook et al., 1999). A més a més, diversos estudis *in vitro* han suggerit que es pot tractar d'un important regulador de la hipertròfia patològica (Choukroun et al., 1998, 1999).

- **p38-MAPK:** a nivell cardíac, s'activa durant la isquèmia (Cook et al., 1999). També s'ha suggerit que p38-MAPK està implicada en la regulació de l'expressió gènica, l'apoptosis, la hipertròfia, la contractilitat, el remodelament i el metabolisme cardíac (Bernardo et al., 2010).

- **PKC (Phosphatase kinase C):** existeixen moltes isoformes de les PKs però les principals isoformes implicades en la hipertròfia cardíaca són la PKC α i la PKC β . Estudis en ratolins sobre la isoforma PKC α han descrit el seu paper en la disfunció contràctil (Braz et al., 2002, 2004). Per altre banda, estudis amb la sobreexpressió de la isoforma PKC β han descrit la seva contribució en la formació de la hipertròfia cardíaca (Bowman et al., 1997) malgrat que en altres estudis realitzats amb animals deficients en aquesta isoforma no s'ha vist afectació (Roman et al., 2001). Per tant, els resultats suggereixen que PKC β és capaç d'induir hipertròfia però no és imprescindible.

- **Senyalització a través del Ca²⁺:**

El Ca²⁺ és molt important per a la contracció cardíaca i per al creixement cardíac. Entre totes les proteïnes implicades en la senyalització per Ca²⁺, a nivell cardíac destaquen:

- **Calcineurina:** actua desfosforil·lant a NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) i induint la seva translocació del citosol al nucli on activa la transcripció dels gens implicats en la resposta hipertròfica (Tham et al., 2015). El paper de la calcineurina s'ha confirmat en pacients amb hipertròfia i insuficiència cardíaca on la seva activitat s'ha trobat augmentada (Haq et al., 2001), i en estudis amb ratolins on s'ha demostrat que la seva pèrdua protegeix contra la hipertròfia (Sussman et al., 1998).

- **CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*):** actua com a segon missatger del GPCR però també és pot activar per la presència d'estrès oxidatiu. Presenta varies isoformes malgrat que la isoforma més destacada en cor és la CAMKII δ c (Tham et al., 2015). Estudis previs han demostrat que l'isoforma CAMKII δ c actua promovent hipertròfia i insuficiència cardíaca (D'Angelo et al., 1997; Zhang et al., 2003). A més a més, recentment s'ha demostrat que també contribueix a la disfunció mitocondrial associada a la hipertròfia i la insuficiència cardíaca (Westenbrink et al., 2015).

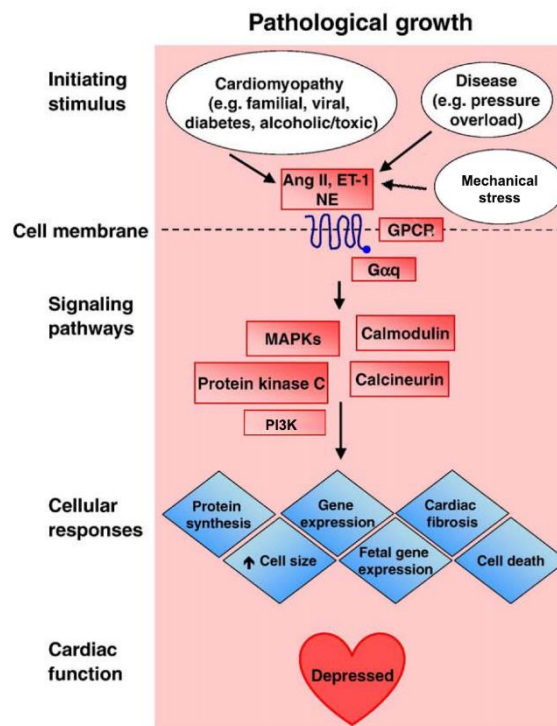


Figura 5. Inducció de la resposta hipertròfica. Els estímuls desencadenants de la hipertròfia activen les vies de senyalització encarregades de la resposta hipertròfica a nivell cel·lular i cardíac. (Imatge adaptada de Bernardo et al., 2010).

3. FIBROSIS CARDÍACA

La fibrosis cardíaca consisteix en una acumulació excessiva de fibres de col·lagen al miocardi que acaba generant disfunció sistòlica i/o diastòlica. Es dona en la majoria de malalties cardiovasculars i sol estar associada a insuficiència cardíaca i a un mal desenllaç d'aquesta. Està present en patologies com la cardiomiopatia hipertensa, la cardiomiopatia alcohòlica, lesions valvulars, la diabetis o l'obesitat (Frangogiannis, 2019). En humans, es considera un marcador de complicacions cardíacques i de predicció de mort en patologies com la insuficiència cardíaca amb una disminució de la fracció d'ejecció o en pacients amb diabetis (Aoki et al., 2011; Wang et al., 2017). Per contra, en l'infart de miocardi la fibrosi cardíaca pot arribar a tenir un paper protector ja que substitueix els cardiomiòcits morts i dona una estructura que permet al cor continuar funcionant correctament.

La fibrosis es dona en diferents fases i la seva capacitat de revertir-se depèn del grau d'extensió i de la durada de la lesió. La fase inicial, es produeix just després de l'estímul desencadenant, i actua promovent l'alliberació de citocines pro-inflamatòries i factors de creixement per part del teixit i també un augment dels seus nivells circulants. En la fase efectiva, aquestes citocines i factors de creixement s'uneixen als seus receptors situats als fibroblasts promovent la seva activació a miofibroblasts. En l'última fase, els miofibroblasts activats alliberen grans quantitats de fibres de col·lagen i factors pro-fibròtics que contribueixen a alterar la matriu extracel·lular (MEC) i a expandir la resposta fibròtica respectivament (Ma et al., 2018).

3.1 TIPUS DE FIBROSIS

Per tal de poder detectar la fibrosis cardíaca a nivell histològic existeixen diferents tincions que permeten marcar les fibres de col·lagen de forma específica. Algunes de les tincions més utilitzades per a detectar la fibrosis són la *Sirius Red* que tenyeix les fibres de col·lagen de color rosa fosc o la *Trichrome Masson* que les tenyeix de color blau.

A nivell histològic, la fibrosis es classifica en: (Figura 6)

- **Fibrosis de substitució:** l'acumulació de fibres de col·lagen i proteïnes de la MEC es troba situada en zones on s'ha produït una mort massiva de cardiomiòcits per tal de mantenir l'estructura i el funcionament cardíac. Es dona com a conseqüència del procés de reparació del dany generat pels cardiomiòcits morts durant l'infart de miocardi.
- **Fibrosis intersticial :** l'acumulació de fibres de col·lagen i proteïnes de la MEC es troba situada en la zona intersticial del teixit.
- **Fibrosis perivascular:** l'acumulació de fibres de col·lagen i proteïnes de la MEC es troba situada al voltant dels vasos sanguinis.

La fibrosis intersticial i la perivascular es donen com a conseqüència de l'activació de les vies pro-fibròtiques i en absència d'una mort massiva de cardiomiòcits. Són característiques de la cardiomiopatia hipertensa, alcohòlica, diabètica, etc (Frangogiannis, 2019).

A més a més, les tincions histològiques també ens permeten analitzar el grau d'entrecruament de les fibres de col·lagen (Hinderer and Schenke-Layland, 2019). Un augment en

l'entrecreament de les fibres de col·lagen és molt perjudicial ja que dificulta la contracció cardíaca i, en situacions de sobrecàrrega de treball pot generar símptomes d'insuficiència cardíaca (López et al., 2016).

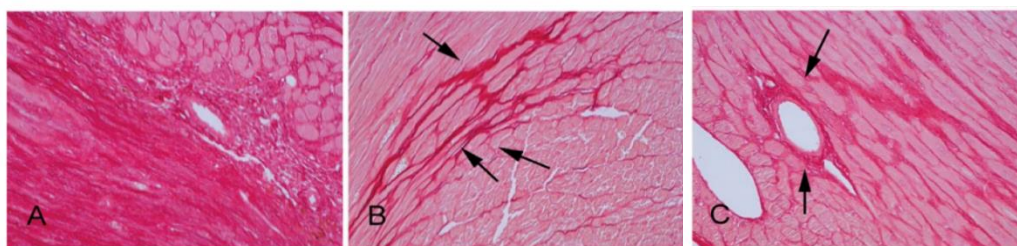


Figura 6. Talls histològics amb la tinció *Sirius-Red* específica per observar fibrosi. Les fletxes indiquen les fibres de col·lagen tenyides de color rosa fosc. A: Imatge microscòpica característica d'una fibrosi per substitució que es troba substituint els cardiomiòcits morts en una àrea infartada; B: Imatge microscòpica característica d'una fibrosi intersticial on les fibres de col·lagen es troben situades a l'interstici del teixit cardíac; C: Imatge microscòpica característica d'una fibrosi perivascular on les fibres de col·lagen es troben rodejant els vasos sanguinis (Kong et al., 2014).

3.2 FIBROBLASTS CARDÍACS

Els fibroblasts cardíacs són el principal tipus cel·lular implicat en la fibrosi cardíaca. Representen el 60-70% de les cèl·lules en el cor humà. Estan organitzats en capes paral·leles a les fibres musculars i situades entre les capes dels cardiomiòcits. Els fibroblasts tenen un paper molt important a nivell cardíac ja que s'encarreguen de sintetitzar i secretar les fibres de col·lagen tipus I i tipus III, de mantenir l'estructura física i facilitar la contracció.

Després del naixement, el cor ha de suportar un augment de la pressió que fa que es produeixi una gran expansió del nombre de fibroblasts (Kong et al., 2014). Els fibroblasts cardíacs poden tenir un origen mesenquimal durant el desenvolupament o de cèl·lules mare progenitores que es troben a la circulació sanguínia o al propi cor (Porter and Turner, 2009).

Durant el desenvolupament de la fibrosi cardíaca en les diferents patologies es produeix un canvi de fibroblasts a miofibroblasts (Ma et al., 2018).

3.3 TRANSICIÓ DE FIBROBLAST A MIOFIBROBLAST

Els fibroblasts responen a diferents estímuls perjudicials com un augment de la mort cel·lular, un augment de la pressió o del volum en el ventricle esquerre, inflamació o canvis metabòlics activant-se a miofibroblasts. Aquests miofibroblasts poden procedir de fibroblasts residents al cor, de progenitors hematopoètics de la medul·la òssia que estan en la circulació sanguínia o de cèl·lules endotelials (Porter and Turner, 2009). Fenotípicament, els miofibroblasts deriven de fibroblasts cardíacs però presenten trets específics de cèl·lules musculars llises com la formació de fibres d'estrès contràctils i un reticle endoplasmàtic molt extens. Es caracteritzen per la secreció de proteïnes de la MEC (col·lagen, fibronectina...), alliberament de citocines i factors de creixement o l'expressió de la proteïna *α-smooth muscle actin* (α -SMA) (Figura 7) (Kong et al., 2014; Tomasek et al., 2002). A més a més, presenten una major capacitat de migració, proliferació i secreció de factors profibròtics (Porter and Turner, 2009).

L'activació dels miofibroblats està regulada per diferents factors com citocines inflamatòries, quimosines, ET-1, Ang II o TGFβ1 (*Transforming growth factor β*) (Figura 7). Tant l'Ang II com el TGFβ1 s'encarreguen d'augmentar l'expressió i síntesi de proteïnes de la MEC i promouen la síntesi i secreció d'altres factors profibròtics (Berk et al., 2007; Kong et al., 2014; Ma et al., 2018).

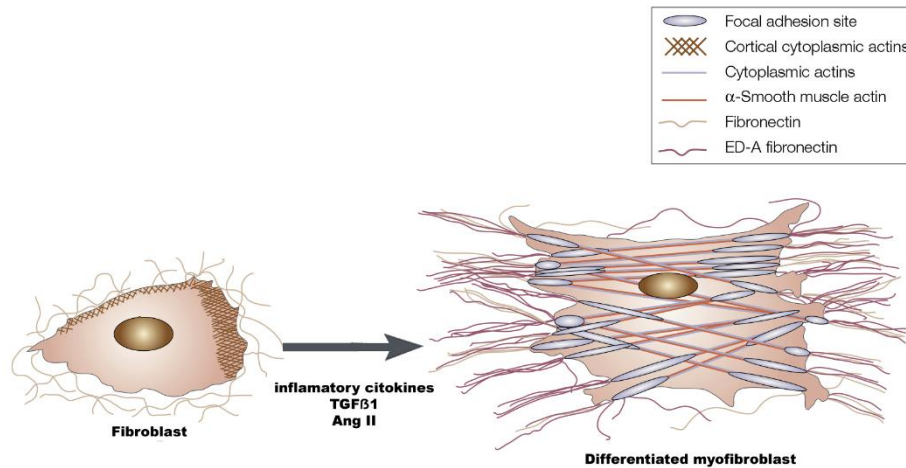


Figura 7. Representació de la transformació de fibroblast a miofibroblast. Davant un estímul com TGFβ1 i Ang II els fibroblasts cardíacs seran activats a miofibroblasts. Els miofibroblasts presenten una sèrie de transformacions entre les quals destaquen l'aparició de llocs d'adhesió focal i la presència de la proteïna α-SMA. (Imatge adaptada de Tomasek et al., 2002).

El TGFβ1 és un factor clau en la resposta fibròtica. Pot actuar sobre cèl·lules del sistema immune o els propis cardiomiòcits contribuint a l'alliberació de factors pro-fibròtics que actuaran de forma paracrina en els fibroblasts. També pot actuar de forma directa sobre els fibroblasts desencadenant la seva activació a miofibroblasts (Figura 8). El TGFβ1 promou la síntesi de fibres de col·lagen així com la inhibició dels enzims encarregats de degradar la MEC, per tal d'afavorir l'acumulació de proteïnes en la MEC (Kong et al., 2014). Actua a través de la via de senyalització de SMAD2/SMAD3. El seu paper en la fibrosi s'ha confirmat en estudis en ratolins on es demostra que la sobreexpressió cardíaca de TGFβ1 està associada a un augment de la fibrosi cardíaca (Rosenkranz et al., 2002).

L'Ang II és un altre factor clau en la inducció de la fibrosi i actua directament a través del receptor d'Angiotensina 1 (receptor AT1) (Figura 8) o indirectament a través de la inducció de TGFβ1. S'han descrit diverses vies de senyalització a través de les quals l'Ang II pot actuar tot i al final totes convergeixen en l'activació de la via JNK. A més a més, l'Ang II incrementa l'expressió de SMAD2 i augmenta la translocació nuclear de la forma fosforil·lada de SMAD3 facilitant l'acció de TGFβ1 (Berk et al., 2007; Tomasek et al., 2002).

L'activació dels miofibroblasts també està regulada de forma paracrina per altres cèl·lules del teixit cardíac com les cèl·lules del sistema immune i els cardiomiòcits. Les cèl·lules del sistema immune del cor poden contribuir a la fibrosi a través de la seva diferenciació directa a miofibroblasts, de l'alliberació massiva de citocines inflamatòries (IL1β, TNFα, IL-6) i factors de creixement pro-fibròtics (TGFβ1) i per últim, amb la formació d'Ang II o la secreció de proteases

que modificaran la MEC. Malgrat això, alguns articles han descrit que també poden tenir un paper anti-fibròtic en determinades situacions (Kong et al., 2014). Els cardiomiòcits també contribueixen a la fibrosis a través de la secreció de citocines pro-inflamatòries o factors de creixement en resposta al dany (Figura 8) (Ma et al., 2018).

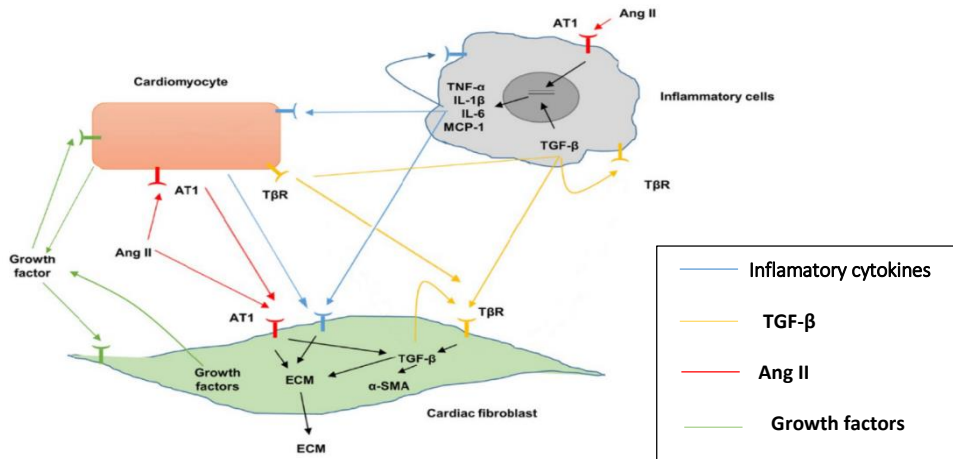


Figura 8. Procés de senyalització implicat en la formació de la fibrosis i la interacció dels diversos tipus cel·lulars. L'alliberació de citocines pro-inflamatòries (TNF α , IL-6, etc) principalment per les cèl·lules del sistema immune, o en menor escala per part dels cardiomiòcits, juntament amb l'alliberació de TGF β i Ang II activaran els fibroblasts de manera que començaran a expressar α -SMA i a secretar proteïnes a la matriu extracel·lular. A més a més, els miofibroblasts alliberaran factors profibròtics com TGF β o factors de creixement que poden actuar directament sobre ells mateixos o sobre els cardiomiòcits ampliant la resposta fibròtica. (Imatge adaptada de Ma et al., 2018).

Finalment, cal destacar un altre factor important en la regulació de la fibrosis com és l'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu actua regulant la quantitat i la qualitat de les proteïnes de la MEC. Entre els efectes directes de l'estrès oxidatiu destaca la capacitat d'activar TGF β 1 que posteriorment desencadenarà l'activació dels fibroblasts a miofibroblasts (Barcellos-Hoff and Dix, 1996). A més a més, l'estrès oxidatiu també actua com a mediador dels efectes pro-fibròtics de les citocines pro-inflamatòries i de l'Ang II en els fibroblasts (Cheng et al., 2003). Estudis *in vitro* mostren com la fibrosis generada per l'administració d'Ang II és deguda a la formació d'anió superòxid per part de la NADPH oxidasa (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) (Lijnen et al., 2006). Aquest efecte de l'estrès oxidatiu també es dona en estudis *in vivo* on s'ha demostrat que l'Ang II activa quinases sensibles als nivells d'estrès oxidatiu i, que aquestes són necessàries per la resposta fibròtica al cor (Ohtsu et al., 2005).

3.4 MATRIU EXTRACEL·LULAR

Els fibroblasts i miofibroblasts alliberen el procol·lagen a la MEC on serà convertit en fibres de col·lagen tipus I o III mitjançant les proteases del procol·lagen (PCP) que s'encarreguen de tallar els extrems N-terminal i C-terminal. Finalment, l'enzim lisil oxidasa (LOX) s'encarrega de l'entrecreuament de les molècules de col·lagen per formar fibres insolubles i rígides que s'uniran covalentment per formar el col·lagen madur (Voloshenyuk et al., 2011).

La composició de la matriu extracel·lular és diferent a cada teixit. En condicions fisiològiques, la MEC del cor està formada per un 85% de fibres de col·lagen tipus I i un 10% de fibres de col·lagen tipus III juntament amb elastina, fibronectina, glicoproteïnes, proteoglicans, factors de creixement o proteases latents que s'activaran en resposta a un dany. El col·lagen tipus I s'associa amb unes fibres denses que ofereixen resistència a la tracció durant la contracció, en canvi el col·lagen tipus III forma fibres primes que mantenen l'elasticitat de la MEC. La MEC cardíaca no només crea una estructura de suport sinó que també s'encarrega de transmetre l'estímul elèctric durant la contracció cardíaca. (Frangogiannis, 2019; Li et al., 2018).

En una situació fisiològica, els fibroblasts regulen la matriu extracel·lular per tal de mantenir un bon funcionament cardíac. Per contra, en una situació de dany cardíac (hipertensió, alcoholisme, obesitat, envelliment, etc.) es desencadena una situació d'inflamació amb un augment de l'alliberació de citocines i factors de creixement en el teixit. L'alliberació de les citocines pro-inflamatòries afavoreix l'activació dels fibroblasts a miofibroblasts i, també l'activació de les metalopeptidases de la matriu (MMP) per tal de trencar la MEC i afavorir la seva migració a la zona danyada per reparar-la. Però si aquest dany es manté en el temps, els miofibroblasts activats alliberaran grans quantitats de proteïnes a la MEC i factors pro-fibròtics alterant la funció cardíaca. Aquest canvi està regulat per factors autocrins i paracrins del miocardi juntament amb hormones endocrines procedents de la circulació sanguínia.

Tal i com s'acaba de descriure, durant la fibrosis els miofibroblasts tendeixen a acumular un excés de fibres de col·lagen alterant l'equilibri i provocant alteracions funcionals. Per altre banda, un excés o una manca en la degradació de les fibres de col·lagen també s'ha associat amb problemes cardíacs. Els enzims encarregats de la degradació de les proteïnes de la MEC són les metalopeptidases de la matriu i els seus inhibidors són els inhibidors tissulars de les metalopeptidases (TIMP). Els subtipus de MMPs més expressades en el cor són les MMP2, MMP9 i MMP13 (Li et al., 2018). S'ha descrit que les MMPs estan augmentades després de l'infart de miocardi i que els seus nivells correlacionen amb el grau de disfunció del ventricle esquerre en pacients amb insuficiència cardíaca (DeLeon-Pennell et al., 2017). Estudis en animals deficients en els gens de les MMPs han demostrat una disminució de la fibrosis en comparació als animals *wild type* (WT) després de ser sotmesos a hipertensió (Heymans et al., 2005; Matsusaka et al., 2006). Els miofibroblasts són els encarregats d'aconseguir l'equilibri de la MEC regulant l'alliberació tant de les fibres de col·lagen com les MMP i els TIMPS. Quan es generen desequilibris en la MEC, ja siguin per un increment en la deposició o per un excés de la degradació, es produeixen alteracions a nivell de la funció sistòlica i/o diastòlica i arrítmies. Totes aquestes alteracions són conseqüència de problemes en la contracció del múscul cardíac, a la manca de difusió de l'oxigen en situacions d'alta demanda energètica, a la pèrdua de les unions cèl·lula-matriu, a canvis en l'estructura que acull els cardiomiòcits o a la secreció de factors que inhibeixen la funció dels cardiomiòcits (Frangogiannis, 2019).

4. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR

4.1 HIPERTENSIÓ

Actualment, la hipertensió és un problema greu de salut i amb previsió d'augmentar any rere any. Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut, l'any 2013 va causar gairebé la meitat de les morts per motius cardiovasculars. Amb només dos dècades, ha passat de ser el quart factors de risc cardiovascular al primer (Bromfield, 2014).

La hipertensió consisteix en un augment sostingut de la pressió arterial. Inicialment és asimptomàtica però a llarg termini produeix afectacions a nivell cardíac, cerebral o renal. En individus adults, es considera que la pressió sistòlica en repòs ha d'estar entre 100-130 mm Hg i la pressió diastòlica entre 60-80 mm Hg (Poulter et al., 2015). Per sobre d'aquests valors ja es considera que l'individu presenta hipertensió.

A nivell cardíac, la hipertensió acaba generant la patologia coneguda com a cardiomiopatia hipertensa. Es caracteritza per la presència d'hipertròfia i disfunció sistòlica i/o diastòlica del ventricle esquerre. A nivell clínic, es manifesta en forma d'arrítmies o insuficiència cardíaca. Primerament, es va descriure la hipertròfia generada per la hipertensió com un mecanisme d'adaptació a les fortes pressions que exerceix la sang sobre les parets del cor per mantenir el flux sanguini. Més tard s'ha vist que la presència d'altres malalties (obesitat, diabetis, etc) o bé factors genètics, de gènere o ètnics també poden afavorir l'aparició d'hipertròfia. A més, com que aquesta hipertròfia no és suficient per combatre l'excés de pressió, el cor també pateix altres alteracions estructurals i funcionals (González et al., 2018; Moreno et al., 2017).

4.1.1 FACTORS IMPLICATS EN EL REMODELAT CARDÍAC

El remodelat cardíac degut a la hipertensió inclou l'aparició d'hipertròfia cardíaca per combatre l'estrès sobre les parets del cor. A més, va acompanyat d'una situació d'inflamació, reducció del nombre de vasos sanguinis creant situacions d'hipòxia i mort cel·lular que acaba promovent l'aparició de la fibrosis cardíaca (Figura 9).

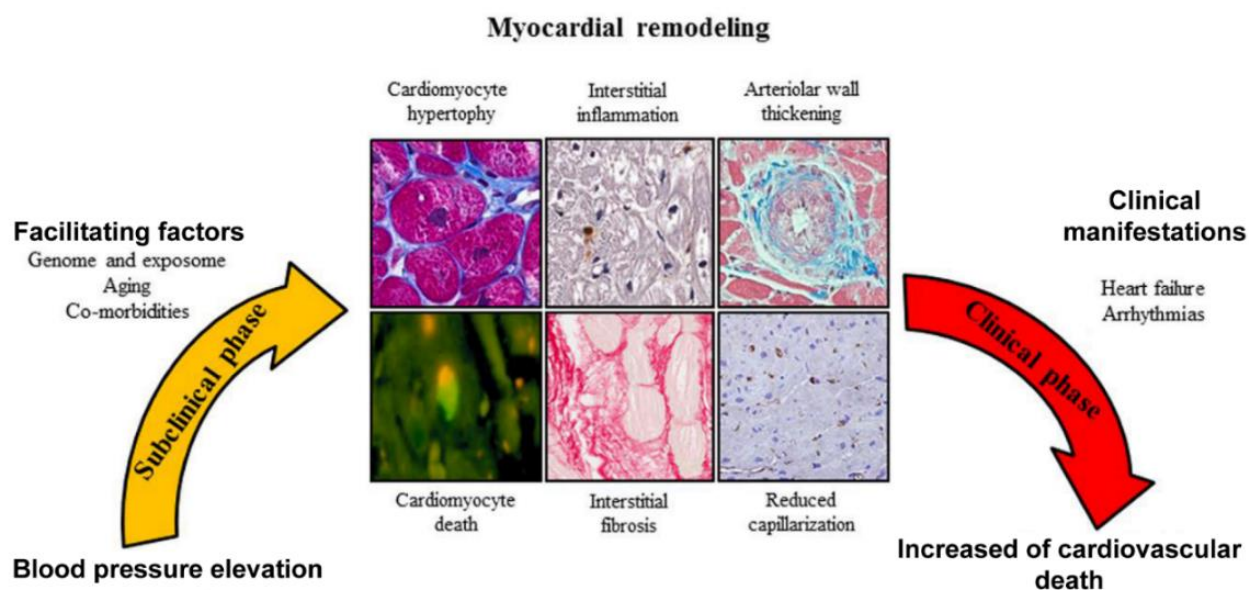


Figura 9. Evolució clínica associada a la hipertensió. Un augment de la pressió arterial prolongat en el temps és el desencadenant de la cardiomiopatia hipertensa. A la part central de la figura, imatges representatives dels processos associats al remodelat cardíac observades amb diferents tècniques de microscòpia. Finalment, el remodelat cardíac es manifesta en forma d'arrítmies o insuficiència cardíaca i amb un augment del risc de mort cardiovascular (Imatge adaptada de González et al., 2018).

4.1.1.1 Hipertròfia

Els cardiomiòcits responen a l'excés de pressió arterial augmentant la seva mida per reduir l'estrès sobre les parets del cor. Els mecanosensors (integrines, transportadors iònics ...) recullen l'excés de pressió i activen les vies de senyalització intracel·lular encarregades de la resposta hipertròfica. Per una part, es produeix una alliberació de neurohormones com catecolamines, Ang II, factors de creixement o citocines per part de les cèl·lules adjacents que amplifiquen la resposta hipertròfica i, seguidament es produeix un augment en la síntesi i l'estabilitat proteica que té com a conseqüència l'augment en la mida dels cardiomiòcits (González et al., 2018). Com ja s'ha comentat anteriorment, el procés d'hipertròfia va acompanyat d'alteracions en el metabolisme provocant una disminució en la producció d'ATP i fent que la hipertensió es manifesti a nivell clínic amb insuficiència cardíaca (Rubattu et al., 2015).

En humans, la hipertròfia generada per la hipertensió pot ser tant concèntrica com excèntrica i depèn de diversos factors com el temps o la intensitat de la pressió arterial, factors demogràfics, presència d'altres patologies, nivells de neurohormones i factors genètics (Drazner, 2011; Santos and Shah, 2014).

4.1.1.2 Estrès oxidatiu

La hipertensió va associada a l'aparició d'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu consisteix en un desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la seva eliminació. Les espècies reactives d'oxigen es poden classificar en dos tipus: radicals lliures (anió superòxid: O_2^- ; òxid nítric: NO; anió hidroxil: OH^-) o molècules derivades de l'oxigen (peròxid d'hidrogen: H_2O_2 ; peroxinitrit: $ONOO^-$). És molt important la regulació dels nivells de ROS ja que s'encarreguen de

modular vies de senyalització cel·lular i poden tenir efectes tòxics per la cèl·lula. Quan hi ha un augment dels nivells de ROS, aquests oxiden diferents components de la cèl·lula com les membranes cel·lulars (peroxidació lipídica), les proteïnes (oxidació de proteïnes) o el DNA (*Deoxyribonucleic acid*) (oxidació del DNA) provocant-los alteracions. Les molècules resultants d'aquests processos s'utilitzen com a marcadors d'estrès oxidatiu (Rababa'h et al., 2018). Diversos estudis han demostrat que un excés de ROS va associat a problemes cardiovasculars (Lynch et al., 2015; Songbo et al., 2019).

La hipertensió està mediada pel sistema de renina-angiotensina i, sobretot per l'Ang II. L'Ang II actua sobre la NADPH oxidasa promovent l'alliberació d'anió superòxid en les cèl·lules endotelials i vasculars del múscul llis, seguit d'una vasodilatació i un augment de la pressió arterial (Griendling et al., 1994; Landmesser et al., 2002; Rajagopalan et al., 1996). S'han provat diferents estratègies per combatre la hipertensió, una d'elles consisteix en reduir l'estrès oxidatiu activant els enzims encarregats d'eliminar les espècies reactives d'oxigen. Uns dels enzims antioxidants més involucrats en combatre la hipertensió són la superòxid dismutasa 2 (SOD2) ja que converteix l'anió superòxid en peròxid d'hidrogen i, la catalasa que finalment converteix el peròxid d'hidrogen en aigua. Estudis amb ratolins que sobreexpressen la catalasa a nivell mitocondrial presenten protecció contra la hipertròfia, el dany mitocondrial i la fibrosis induïda per la hipertensió en el model d'hipertròfia hipertensiva per administració d'Ang II (Dai et al., 2011).

4.1.1.3 Inflamació

La hipertensió va acompanyada d'un augment en la inflamació cardíaca i, és un dels factors clau en el dany produït per l'excés de pressió. Els cardiomiòcits danyats per l'excés de pressió arterial alliberen molècules (fragments cel·lulars, DNA, etc) a l'espai extracel·lular per estimular a les cèl·lules del voltant a alliberar citocines pro-inflamatòries a la circulació sanguínia i així reclutar leucòcits a la zona per reparar el dany (González et al., 2018). Diversos estudis en animals d'experimentació confirmen el paper de la inflamació en la hipertensió. S'ha demostrat que la inducció d'hipertensió mitjançant l'administració de Ang II augmenta l'alliberament de citocines a la circulació sanguínia així com un major reclutament de cèl·lules pro-inflamatòries al cor (Behr et al., 2004). Aquest augment dels nivells circulants de citocines pro-inflamatòries també s'ha detectat en pacients amb hipertensió (Dalekos et al., 1997).

Una altra de les conseqüències de la inflamació és l'augment de l'estrès oxidatiu a l'endoteli de la microvasculatura provocant una disminució en els nivells d'òxid nítric del miocardi que desencadena hipertròfia i rigidesa en els cardiomiòcits. Aquest fenomen s'ha descrit tant en models animals com en humans (Franssen et al., 2016).

Finalment, tal i com ja s'ha comentat a l'apartat de fibrosi, cal destacar que la inflamació actua com a desencadenant de la resposta fibròtica promovent l'activació dels fibroblasts a miofibroblasts.

4.1.1.4 Apoptosi

La hipertensió s'associa amb un augment de l'apoptosi en els cardiomiòcits tant en models animals com en humans (Ravassa et al., 2007). Tant el dany produït pel propi excés de pressió com la resposta hipertròfica actuen com a desencadenants de l'apoptosis. Durant el procés hipertròfic, hi ha un gran augment en la síntesis de proteïnes que pot acabar induint estrès de reticle i afavorint la formació de proteïnes mal plegades. Tot això, actua com a desencadenant de la mort cel·lular programada (Dickhout et al., 2011).

L'apoptosi també té un paper important en la disfunció del ventricle esquerre. Per una banda, la pèrdua massiva de cardiomiòcits disminueix la capacitat de contracció i, a més a més, predisposa a una nova ordenació cel·lular que pot generar dilatació del ventricle esquerre. Per altra banda, també s'ha descrit que els cardiomiòcits morts poden alliberar substàncies (citocrom c, caspasa 3, etc) que interfereixen en la producció d'energia i en el funcionament dels cardiomiòcits sans. Malgrat l'apoptosi és la via de mort cel·lular més característica en la hipertensió també hi ha una activació d'altres vies de mort com la necrosis, així com processos d'autofàgia durant el desenvolupament d'aquesta patologia (González et al., 2003).

4.1.1.5 Microvasculatura coronària

La hipertensió provoca alteracions a la microvasculatura. Durant el procés d'hipertròfia es dona un augment de la massa del ventricle esquerre però aquesta no sempre va acompanyada de l'augment necessari de nous vasos sanguinis per suplir les noves necessitats del teixit. A més a més, la formació de fibrosi al voltant d'artèries i arterioles dificulta la difusió d'oxigen al teixit. Tot això fa que el cor presenti símptomes d'isquèmia i a nivell clínic, es manifesta en forma d'arrítmies o fins i tot mort sobtada (González et al., 2018).

4.1.1.6 Fibrosis

La hipertensió genera un augment de la fibrosi cardíaca. Tant l'augment de la inflamació com l'augment de l'estrès oxidatiu durant la hipertensió acabaran amb l'alliberació de l'Ang II i el TGF β 1, que seran els responsables de desencadenar la formació de la fibrosi (Kong et al., 2014). L'excés de fibres de col·lagen al miocardi disminueix la capacitat contràctil del cor afavorint la disfunció del ventricle esquerre i la formació d'arrítmies (Moreno et al., 2017). En humans, diversos estudis han corroborat aquesta associació entre fibrosi i disfunció cardíaca (Díez et al., 2002; Kasner et al., 2011). També s'ha descrit que un elevat grau d'entrecreuament de les fibres de col·lagen tipus I correlaciona amb hospitalització i fins i tot, amb mortalitat (López et al., 2016).

4.1.2 TRACTAMENT

La hipertensió és un dels factors de risc cardiovascular més habitual i, també dels més fàcils de tractar. El tractament consisteix en fàrmacs per reduir la pressió arterial i, un dels principals objectius és evitar el dany renal i, sobretot el dany cardíac. Malgrat existeixen molts tipus de fàrmacs antihipertensius, alguns dels més utilitzats són:

- **Diürètics:** provoquen l'eliminació d'aigua i sodi a través de l'orina evitant l'augment de la pressió arterial.
- **Antagonistes dels receptors mineralocorticoids o d'aldosterona:** s'uneixen a aquest receptor impedit que l'aldosterona el pugui activar provocant un augment de la pressió arterial.
- **Inhibidors de l'enzim convertidor de l'Angiotensina:** impedeixen la formació de l'Ang II que és la forma encarregada de desencadenar la hipertensió.
- **Antagonistes dels receptors AT1 de l'Angiotensina II:** bloquegen el receptor per evitar l'acció de l'Ang II afavorint el relaxament muscular i evitant la sobrecàrrega cardíaca (Parra and Hough, 2014).

Tot i l'eficàcia d'aquests fàrmacs, s'estan buscant noves dianes terapèutiques ja que no són efectius per a tota la població. Alguns d'aquests nous fàrmacs en etapes preliminars d'estudi són per exemple: inhibidors de vasopectidases, agonistes del pèptid natriurètic A, agonistes de l'enzim convertidor d'Ang II a Ang (1-7) o vacunes per activar el sistema immune i eliminar l'Ang II (Oparil and Schmieder, 2015). A més a més, en els últims anys també s'han descobert noves dianes terapèutiques i nous fàrmacs experimentals específics per tractar el remodelat cardíac associat a la cardiomiopatia hipertensa (Taula 3). En aquest cas, les noves dianes estan enfocades a prevenint la hipertròfia cardíaca, la fibrosi, la mort cel·lular i estimular la formació de nous vasos. Entre tots aquests fàrmacs experimentals, els més atractius per traslladar a la clínica són aquells que permeten revertir diversos dels processos implicats en el remodelat cardíac. Malgrat el seu gran potencial, aquests fàrmacs hauran de passar per estudis pre-clínic i clínic abans de poder ser traslladats a pacients amb hipertensió (González et al., 2018).

	Diana terapèutica	Fàrmac
A nivell de cardiomiòcits		
Prevenir el dany i la mort	Drp1	Mdivi-1
	Cardiolipin	MTP, SS-31
Prevenir la hipertròfia	CXCL1	Anticòs
	CXCR2	SB265610
Preservar la funció	Cardiolipin	MTP
A nivell intersticial		
Inhibir la inflamació	p38MAPK	FR167653
	TLR2	Anticòs
	CXCL1	Anticòs
	CXCR2	SB265610
Revertir la fibrosis	p38MAPK	FR167653
	TLR2	Anticòs
	CXCL1	Anticòs
	CXCR2	SB265610
	TGFβ1	Antagonista del receptor
	LOX	Torasemide, EXP3179
A nivell de la microvasculatura		
Estimular l'angiogènesis	AMPKα2/VEGF	Anti-miR-195a-3p
Restaurar la funció endotelial	Cardiolipin	MTP
Revertir el remodelat vascular	ADAM-17	Anticòs A9B8

Taula 3. Noves dianes terapèutiques proposades per combatre el remodelat cardíac associat a la hipertensió. Abreviacions: ADAM 17:disintegrin and metalloproteinase; AMPK:AMP-actived protein kinase; CXCL1:chemokine (CXC motif) ligand 1; CXCR2:chemokine (CXC motif) receptor 2; Drp-1:dynamin-related-protein 1; LOX:lysil oxidase; p38 MAPK:p38 mitogen-activated protein kinase; TGFβ1:transforming growth factor 1; TLR2:toll-like receptor 2; VEGF:vascular endothelial growth factor (Taula adaptada de González et al., 2018).

4.2 ALCOHOLISME

Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) publicades l'any 2018, l'alcoholisme va ser la causa de gairebé el 6% de les morts a nivell mundial.

L'OMS ha establert uns criteris per determinar el risc cardiovascular associat al consum d'alcohol, que varien en funció del gènere (Figura 10).

	Men	Women
Low-risk drinking	≤2 drinks/day	≤1 drink/day
Moderate drinking	3–4 drinks/day	2–3 drinks/day
High-risk drinking	≥5 drinks/day	≥4 drinks/day
Binge-drinking	>5 drinks/occasion	>4 drinks/occasion

Figura 10. Classificació del risc cardiovascular segons el consum diari d'alcohol. 1 standard drink = 10-12g d'etanol (Mirijello et al., 2017).

L'alcohol i els metabòlits resultants de la seva metabolització tenen la capacitat de danyar els orgànuls intracel·lulars. S'uneixen als fosfolípids de les membranes, als canals iònics, als receptors, al DNA ... alterant-ne la seva estructura i funció. A nivell cardíac, també provoquen alteracions en la síntesi de proteïnes i afecten al recanvi de les proteïnes estructurals (actina, miosina, troponina i titina) juntament amb una activació de les vies inflamatòries. A més a més, desencadenen un augment de l'estrès oxidatiu i del dany mitocondrial que comportaran la mort cel·lular i, promouran el dany cardíac (Fernández-Solà and Porta, 2016).

El dany cardíac desencadenat pel consum d'alcohol és proporcional a la quantitat i al temps de consum. Malgrat això, altres factors com el gènere, la raça o la genètica poden modular la resposta del dany induït per l'alcohol. Fa anys es va descriure que el consum moderat de begudes alcohòliques que contenien resveratrol podia tenir efectes protectors a nivell cardiovascular. Actualment, aquests estudis generen molta discrepància ja que es creu que els resultats protectors podrien ser deguts a algun altre factor de l'estudi i no a les begudes alcohòliques (Fernández-Solà, 2015). Malgrat tot, el què està àmpliament acceptat és que el consum crònic d'alcohol és perjudicial ja que promou l'augment d'estrès oxidatiu a la vasculatura i un augment de la pressió sanguínia que pot derivar en hipertensió (Rehm and Roerecke, 2017).

Els principals òrgans afectats per l'alcohol són el fetge, el tracte digestiu, el cervell i, finalment el cor. El seu consum crònic està associat a l'aparició de moltes malalties com trastorns mentals i del comportament, cirrosi hepàtica, càncer o malalties cardiovasculars (Rehm et al., 2010; Shield et al., 2014). A nivell cardíac, el consum crònic d'alcohol dona lloc a l'aparició de la cardiomiopatia alcohòlica. Aquesta es caracteritza per la dilatació del ventricle esquerre, per una disminució o no de la paret del ventricle esquerre, un augment de la massa del ventricle esquerre i, finalment una reducció de la fracció d'ejecció (<40%) (Piano and Phillips, 2014). A més a més, va acompanyada de canvis a nivell histològic (fibrosi), cel·lular (hipertròfia) i estructurals (Zhang and Ren, 2011).

Al llarg d'aquesta tesi ens centrarem bàsicament en explicar els efectes que produeix el consum crònic d'alcohol ja que és el protocol que hem utilitzat per simular el dany cardíac que pateixen

els pacients amb alcoholisme. Per això, és important comentar que els canvis cel·lulars que es produeixen durant el consum agut d'alcohol són diferents als del consum crònic (Steiner and Lang, 2017).

4.2.1 METABOLISME DE L'ALCOHOL AL COR

L'efecte de l'alcohol pot variar entre teixits i, sobretot depèn de la seva concentració en la sang. L'eliminació de l'alcohol es produeix a través de la seva metabolització (95-98%) i només una petita part serà eliminada per la suor o l'orina directament. Tot i que el principal òrgan implicat en la detoxificació de l'alcohol és el fetge, altres òrgans com el cor també hi participen. L'alcohol és metabolitzat a través de l'alcohol deshidrogenasa (ADH) o el citocrom P450 2E1 (CYP2E1) en el citosol convertint-lo en acetaldehid. Posteriorment, l'acetaldehid passa als mitocondris on serà convertit a acetat per l'enzim aldehid deshidrogenasa 2 (ALDH2). La forma activada de l'acetat és l'acetilCoA i podrà ser metabolitzat en cossos cetònics, àcids grassos, aminoàcids o entrar en el cicle de Krebs produint CO₂ i H₂O com a productes finals de la metabolització de l'alcohol (Figura 11) (Zhang and Ren, 2011).

L'acetaldehid format durant la metabolització de l'alcohol és deu vegades més tòxic que el propi alcohol. Aquest té un paper important en la cardiomiopatia alcohòlica ja que té un efecte directe sobre el cor i reacciona unint-se a grups amino i hidroxil interferint en l'estructura i la funció de proteïnes i enzims (Zhang and Ren, 2011). S'han detectat elevats nivells d'acetaldehid cardíac en pacients amb alcoholisme (Jankala, 2000).

També destaca el paper de CYP2E1 en la cardiomiopatia alcohòlica. Aquest enzim està associat a la producció d'estrès oxidatiu ja que durant la seva reacció allibera un electró del NADH que podrà reaccionar amb els components cel·lulars del voltant generant espècies reactives d'oxigen (Figura 11). Estudis amb animals han confirmat el paper d'aquest enzim en la formació d'estrès oxidatiu, disfunció contràctil i apoptosi a través de l'activació de les vies de senyalització JNK i ASK-1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Zhang et al., 2013).

Finalment, remarcar que la velocitat de metabolització mitjançada per l'ADH i l'ALDH2 són importants per evitar la toxicitat tant de l'alcohol com de l'acetaldehid, però per altra banda, un augment en la seva velocitat pot ser perjudicial ja que la seva reacció està associada al transportador d'electrons NADH i pot alterar l'estat redox de la cèl·lula (Zhang and Ren, 2011).

A partir d'ara, utilitzarem el terme alcohol per englobar els efectes produïts tant per l'alcohol com els productes resultants de la seva metabolització que acabem de veure.

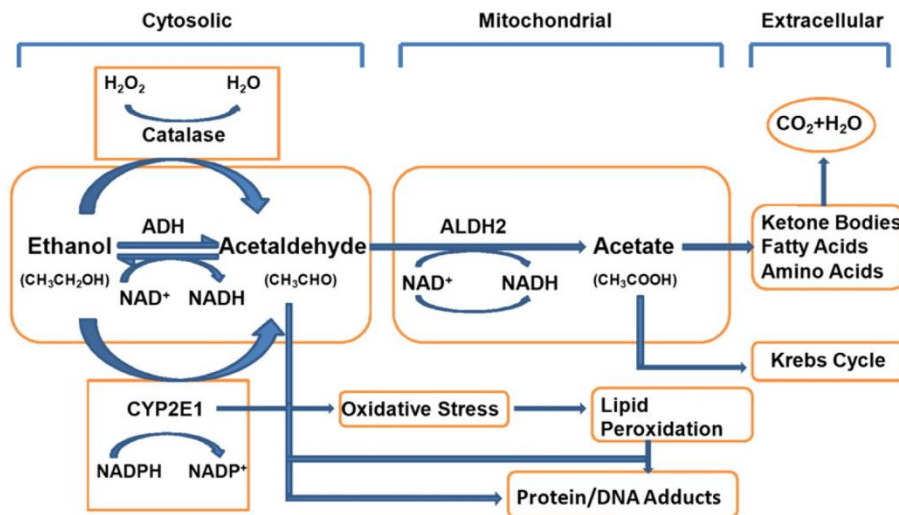


Figura 11. Via de metabolització de l'alcohol. L'alcohol és metabolitzat per l'alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocrom P450 E21 (CYP2E1) i la catalasa. La catalasa s'encarrega de neutralitzar la formació del peròxid d'hidrogen que es forma durant la metabolització de l'alcohol. Finalment, s'evidencia la connexió entre l'enzim CYP2E1 i l'estrès oxidatiu (Zhang and Ren, 2011).

4.2.2 FACTORS IMPLICATS EN EL REMODELAT CARDÍAC

Els mecanismes que contribueixen a la cardiomiopatia alcohòlica són l'estrès oxidatiu, el dany mitocondrial, els canvis en el transport i metabolisme d'àcids grassos i l'apoptosis.

4.2.2.1 Estrès oxidatiu

L'alcohol produeix estrès oxidatiu a través dels següents mecanismes: el metabolisme de l'alcohol, per efecte directe en proteïnes o enzims antioxidants i per l'activació de sistemes neurohormonals que alliberen catecolamines i Ang II. També es coneixen els principals efectes perjudicials que produeix l'estrès oxidatiu i es basen en promoure l'aparició d'hipertrofia, induir canvis en els canals iònics intracel·lulars, provocar alteracions en la funció mitocondrial, disminuir la funció ATPasa, trencar les proteïnes contràctils i induir l'acumulació atípica de greix en el cor que acabarà generant disfunció (Piano, 2017). L'acumulació de ROS pot modificar els orgànuls intracel·lulars unint-se als seus lípids i proteïnes alterant-ne la funció (Piano and Phillips, 2014).

Tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, la producció d'estrès oxidatiu durant el metabolisme de l'alcohol és deguda a l'enzim CYP2E1 que afavoreix la formació de ROS (Zhang and Ren, 2011). A més a més, també s'ha explicat com l'Ang II actua sobre la NADPH oxidasa promovent l'alliberació d'anió superòxid (Landmesser et al., 2002). Finalment, comentar que els mitocondris són font i diana de l'estrès oxidatiu, de manera que les espècies reactives d'oxigen ataquen als mitocondris alterant-ne la seva funció i això, fa que en produeixin més.

A l'hora d'avaluar el paper de l'estrès oxidatiu en el model de consum crònic d'alcohol s'han estudiat els nivells i activitats d'enzims antioxidants així com els nivells dels marcadors d'estrès oxidatiu (peroxidació lipídica, oxidació del DNA, etc.). El consum d'alcohol durant 8 setmanes augmenta els nivells de malonaldehid i de proteïnes carbonilades en un model de rata (Vendemiale et al., 2001). A més a més, també s'ha descrit l'augment dels nivells i l'activitat de la catalasa després del consum crònic d'alcohol per eliminar el peròxid d'hidrogen que es genera

en la seva metabolització tant en models animals com en humans (Fahimi et al., 1979; Vikhert et al., 1986). Aquests resultats obren la porta a que la modulació de les defenses antioxidants puguin ser una diana terapèutica per combatre el dany cardíac. De moment, l'administració d'una molècula que mimetitza l'efecte de la SOD2 tant a nivell *in vitro* com *in vivo* ha permès reduir els nivells de 3-nitrotirosina i la mort cel·lular causada pel consum d'alcohol en els cardiomiòcits (Tan et al., 2012).

En etapes avançades de la cardiomiopatia alcohòlica, els nivells d'estrès oxidatiu són molt elevats i provoquen l'obertura del porus de transició dels mitocondris causant la mort cel·lular per apoptosi (Hoek et al., 2002).

4.2.2.2 Dany mitocondrial

Els mitocondris són molt importants en el cor ja que s'encarreguen de produir l'ATP que posteriorment s'utilitzarà en la contracció del múscul cardíac. El cor és un òrgan amb una elevada demanda energètica, de manera que no és sorprenent que qualsevol alteració en aquest orgànu pugui produir afectacions cardíques (Steiner and Lang, 2017).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'alcohol és capaç de danyar els orgànuls intracel·lulars. En aquest apartat en centrarem en el dany que provoca en els mitocondris que es dona tant a nivell estructural com funcional.

A nivell estructural, l'alcohol provoca alteracions morfològiques com un allargament dels mitocondris i una degeneració de les crestes mitocondrials (Hibbs et al., 1965; Tsiplenkova et al., 1986). Més recentment, s'ha descrit que també produeix una reducció en el nombre de mitocondris però no de la mida (Zhang et al., 2010) i un augment de la fragmentació dels mitocondris (Jing et al., 2011).

A nivell funcional, les principals afectacions de l'alcohol impliquen canvis en el potencial de membrana, alteracions en el funcionament la cadena respiratòria, disminució de la biogènesis mitocondrial i dany al DNA mitocondrial.

La cadena respiratòria està situada a la membrana mitocondrial interna on s'encarrega d'obtenir energia en forma d'ATP. Aquesta via utilitza els electrons del NADH creat en el cicle de Krebs per transportar-los al llarg dels seus complexos generant un gradient de protons a l'espai intermembrana mitocondrial, que finalment serà alliberat a la matriu mitocondrial a través de l'últim complex generant energia en forma d'ATP (Figura 12). Està composta pels següents complexos:

- Complex I (NADH deshidrogenasa)
- Complex II (Succinat deshidrogenasa)
- Complex III (Citocrom B)
- Complex IV (Citocrom C oxidasa)
- Complex V (ATP sintasa)

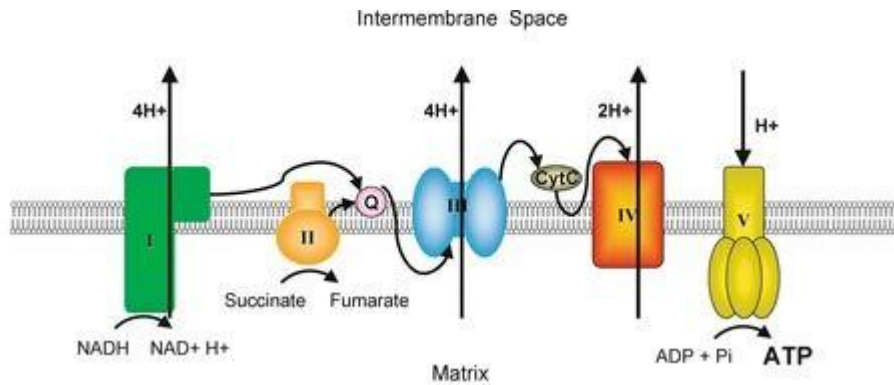


Figura 12. Esquema sobre la composició i funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial.

Alguns dels complexos de la cadena respiratòria (complex I, complex III i algunes subunitats del complex IV) estan codificats en el DNA mitocondrial (DNA mt) mentre que la resta estan codificats en el DNA genòmic.

S'ha demostrat que el consum crònic d'alcohol va associat a una disminució del potencial de la membrana interna mitocondrial (Ma et al., 2010) i a una disminució en l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria (Matyas et al., 2016). Seguint amb aquests resultats, s'ha demostrat que els nivells d'ATP disminueixen amb el consum crònic d'alcohol (Hu et al., 2013; Jing et al., 2011). Aquest conjunt d'afectacions provoquen que els mitocondris no puguin subministrar l'energia suficient per a la contracció del múscul cardíac tal i com s'ha vist en estudis *in vitro* amb cardiomiòcits (Guzzo-Merello et al., 2014) i en pacients amb alcoholisme (Regan et al., 1969).

Una altra de les afectacions provocades per l'alcohol és a nivell de la biogènesis mitocondrial. El consum crònic d'alcohol disminueix la biogènesis mitocondrial reduint l'expressió gènica i proteica de PGC-1 α , UCP2 (*Uncoupling protein 2*) i ERR α a nivell cardíac (Matyas et al., 2016; Zhang et al., 2010). Sembla que aquesta resposta de l'alcohol és depenent del temps d'administració ja que un tractament agut de tres dies no va mostrar cap efecte sobre els nivells proteics de UCP2 (Yuan et al., 2015).

Finalment, el consum d'alcohol provoca alteracions en el DNA mitocondrial (DNA mt). S'ha descrit que en condicions *in vitro* l'alcohol disminueix els nivells de DNA mt mentre que en condicions *in vivo* l'alcohol danya el DNA mt però sense disminuir-ne els nivells (Laurent and Edwards, 2014).

En resum, l'alcohol danya els mitocondris i en compromet el seu funcionament ja que disminueix la seva capacitat d'obtenir energia disminuint els complexos de la cadena respiratòria, disminuint el seu potencial de membrana i atacant el DNA mt que codifica per a complexos de la cadena i altres proteïnes necessàries pel correcte funcionament del mitocondris. Tot això, es veu agreujat pel bloqueig de la biogènesis mitocondrial que impedeix la formació de nous mitocondris funcionals. A més a més, en aquesta situació també s'hi ha de sumar l'efecte de l'estrès oxidatiu comentat a l'apartat anterior, que afecta als mitocondris impedit el seu correcte funcionament.

4.2.2.3 Canvis en el transport i metabolisme d'àcids grassos

L'alcohol i els seus derivats poden unir-se als àcids grassos i modificar-los donant lloc als FAEE (*Fatty acid ethyl esters*). Aquests àcids grassos modificats es poden unir als mitocondris i alternar-ne el seu funcionament (Figura 13). De fet, s'ha vist que els nivells de FAEE augmenten en biòpsies de pacients amb alcoholisme (Lange and Sobel, 1983).

Per altra banda, el consum crònic d'alcohol també s'ha associat amb un augment en l'expressió dels transportadors d'àcids grassos de cadena llarga i un augment dels nivells de triglicèrids en el miocardi (Hu et al., 2013). Diversos estudis descriuen com l'acumulació excessiva de lípids en el cor acaba desencadenant lipotoxicitat i mort cel·lular (Kuwabara et al., 2015; Li et al., 2016; Marín-Royo et al., 2019).

4.2.2.4 Apoptosis

El consum crònic d'alcohol està associat amb un augment de l'apoptosis, que és conseqüència de l'augment dels nivells d'estrès oxidatiu que alteren les funcions cel·lulars i promouen l'obertura del porus de transició mitocondrial (Figura 13).

Els principals marcadors utilitzats per determinar el grau d'apoptosis són els nivells de la caspasa 3, els nivells d'expressió proteica de Bax (promou la resposta apoptòtica) o Bcl 2 (inhibeix la resposta apoptòtica) i la fragmentació del DNA mesurada amb la tècnica de TUNNEL (*Terminal deoxinucleotidil transferasa*). En models animals, s'ha descrit que la ingesta d'alcohol augmenta la fragmentació cel·lular i els nivells de caspasa 3 (Tan et al., 2012). En humans, també s'ha observat un augment de l'apoptosis en biòpsies de pacients amb alcoholisme avaluada a través de la fragmentació del DNA i de l'augment de l'expressió de Bax i Bcl2 per immunohistoquímica (Fernández-Solà et al., 2006, 2011).

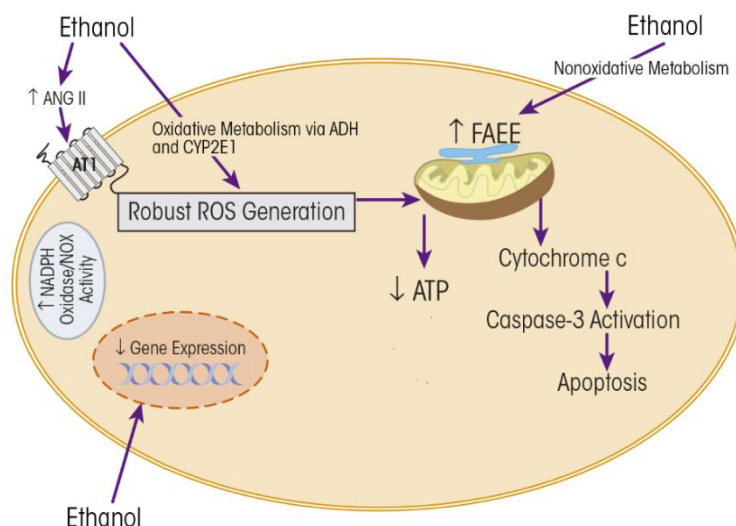


Figura 13. Principals afectacions de l'alcohol a nivell cel·lular. L'alcohol activa la formació d'estrès oxidatiu i dany mitocondrial que acabarà amb la mort cel·lular per apoptosi (Imatge adaptada de Piano, 2017).

4.2.3 TRACTAMENT

No existeix un tractament específic per a la cardiomiopatia alcohòlica. Primerament, el pacient ha de deixar de consumir alcohol i després es subministren els fàrmacs per tractar la insuficiència cardíaca, com bloquejadors β -adrenèrgics o antagonistes dels receptors AT1 de l'Ang II (Piano and Phillips, 2014). Si finalment el tractament farmacològic no és efectiu s'haurà de realitzar un transplantament de cor.

La cardiomiopatia alcohòlica és difícil de diagnosticar ja que és asimptomàtica i amb l'agreujant que els pacients solen amagar la seva addicció a l'alcohol, de manera que quan es detecta està molt avançada i és difícil revertir el dany cardíac. Actualment, han aparegut nous factors de creixement i noves cardioquines amb un gran potencial per tractar les vies implicades en la cardiomiopatia alcohòlica com la hipertròfia, la fibrosis, l'estrès oxidatiu o la regeneració dels cardiomiòcits. Malgrat això, aquests factors encara hauran de passar per diversos estudis pre-clínics i clínics abans de ser aprovats per al seu ús en pacients alcohòlics amb cardiomiopatia (Fernández-Solà and Porta, 2016; Mirijello et al., 2017).

4.3 OBESITAT

L'obesitat ha augmentat de forma dràstica en les últimes dècades. Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut, l'any 2016 un 39% de la població mundial presentava sobrepès i un 13% obesitat.

L'obesitat consisteix en una acumulació anormal o excessiva de greix en l'organisme degut a un desequilibri entre la quantitat de calories ingerides i les calories eliminades. Els individus es classifiquen utilitzant l'índex de massa corporal (IMC). L'IMC consisteix en la relació entre el pes de l'individu i la seva alçada en metres al quadrat (kg/m^2). Aquest índex serveix per classificar els individus segons el seu estat nutricional: IMC < 18.5: pes insuficient, IMC entre 18.5 i 24.9: normopès, IMC entre 25 i 29.9: sobrepès, IMC entre 30 i 34.9: obesitat de grau 1, IMC entre 35 i 39.9: obesitat de grau 2 i IMC > 40: obesitat severa. Quan l'individu presenta un IMC superior a 30 es considera que presenta obesitat (Gadde et al., 2018; Parto and Lavie, 2017).

L'obesitat va associada a l'aparició de molts factors de risc cardiovascular com la hipertensió, la dislipèmia, la resistència a la insulina i la diabetis de tipus 2.

4.3.1 TIPUS DE TEIXIT ADIPÓS

El teixit adipós es pot classificar segons la seva funció en:

- **Teixit adipós blanc (TAB):** les cèl·lules que el formen majoritàriament són els adipòcits blancs i presenten una gran gota lipídica que ocupa gairebé tot el citosol (Figura 14). La principal funció del teixit és emmagatzemar energia. A més a més, també actua com un òrgan endocrí que allibera pèptids (adipocines) i altres metabòlits importants per regular el balanç energètic de l'organisme i la homeòstasi de la glucosa.

En situacions d'excés d'energia el TAB (obesitat, ...) actua emmagatzemant energia, en canvi en situacions de dèficit d'energia (dejuni prolongat, ...) activa la lipòlisi per subministrar àcids grassos a la circulació sanguínia (Luo and Liu, 2016).

- **Teixit adipós marró (TAM):** les cèl·lules que el formen majoritàriament són els adipòcits marró que presenten múltiples gotes lipídiques i una gran quantitat de mitocondris al citosol (Figura 14). La seva principal funció és mantenir la temperatura corporal a través de la termogènesis. Enlloc d'emmagatzemar energia, aquest teixit crema les seves reserves per obtenir calor. La presència de la proteïna UCP1 (*Uncoupling protein 1*) li permet desacoblar la cadena respiratòria mitocondrial de manera que produeix calor enlloc d'ATP. A més a més, el TAM actua com òrgan secretor alliberant batocines que actuen de forma autocrina o paracrina reforçant la termogènesis i afavorint la captació de glucosa o millorant la sensibilitat a la insulina. A nivell endocrí, les batocines actuen en altres òrgans modulant processos metabòlics (Nedergaard, 2014; Villarroya et al., 2017).

Hi ha un ampli coneixement del TAM en ratolins, en canvi en humans es creia que era molt abundant al néixer però que després es perdia amb el temps. Recentment, s'ha descobert la presència de TAM en adults i, aquest s'activa en resposta al fred. També s'ha vist que el grau

d'activació és menor en persones amb obesitat (Cypess et al., 2009; Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009)

A més a més, en determinades condicions com el fred poden aparèixer adipòcits amb les característiques morfològiques i funcionals dels adipòcits marrons dins dels dipòsits de greix blanc. Aquests adipòcits s'anomenen adipòcits beix i tenen una estructura amb múltiples gotes lipídiques i expressen UCP1, de manera que poden dur a terme la termogènesis (Figura 14). El pas d'adipòcit blanc a beix s'anomena *browning* i es desencadena per estímuls prolongats de les vies β -adrenèrgiques (Guglielmi and Sbraccia, 2018). Alguns estudis descriuen que els dipòsits de TAM en humans realment estan formats per adipòcits beix enlloc d'adipòcits marró. Malgrat tot, encara no està clar el paper d'aquestes cèl·lules en humans (Wu et al., 2012).

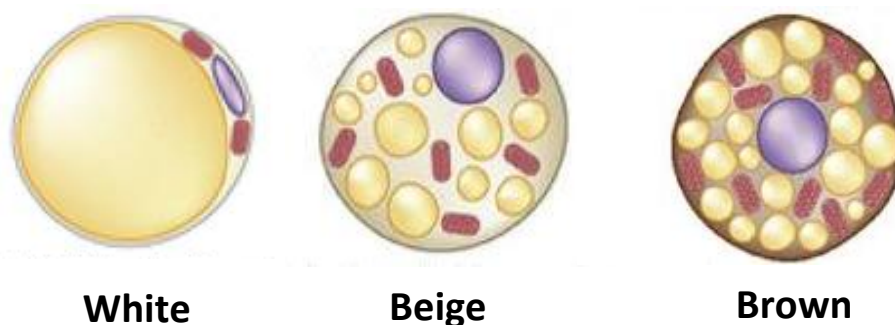


Figura 14. Representació de la morfologia dels tres tipus d'adipòcits. En primer lloc, es mostra un adipòcit blanc amb una gran gota lipídica que ocupa gairebé tot el citoplasma. Seguidament, un adipòcit beix que presenta un augment en el nombre de gotes lipídiques i de mitocondris respecte l'adipòcit blanc. I finalment, un adipòcit marró amb gran quantitat de gotes lipídiques i mitocondris responen a la seva funció oxidativa (imatge adaptada de Stine et al., 2016).

4.3.2 DISTRIBUCIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS EN HUMANS

El teixit adipós blanc es troba distribuït en diferents dipòsits al llarg de l'organisme. Principalment trobem dos tipus de dipòsits: els dipòsits subcutanis situats sota la pell i els dipòsits abdominals situats a l'abdomen i al voltant de les vísceres (Figura 15). A més a més, la distribució del teixit adipós pot variar en funció del gènere (Gesta et al., 2007).

Dipòsits de TAB:

- **Teixit adipós subcutani (TAS):** Inclou els següents dipòsits:
 - cranial
 - facial
 - abdominal
 - femoral
 - gluti
- **Teixit adipós abdominal (TAA):** Inclou els següents dipòsits:
 - omental
 - retroperitoneal

- visceral (TAV)

El teixit adipós marró també es troba distribuït en diferents dipòsits al llarg de l'organisme. Tot i això, en humans es sol treballar amb els dipòsits de teixit adipós marró supraclavicular o cervical (Figura 15) ja que són de fàcil accés i existeixen diferents eines no invasives (càmera termogràfica, etc) que en permeten mesurar l'activitat.

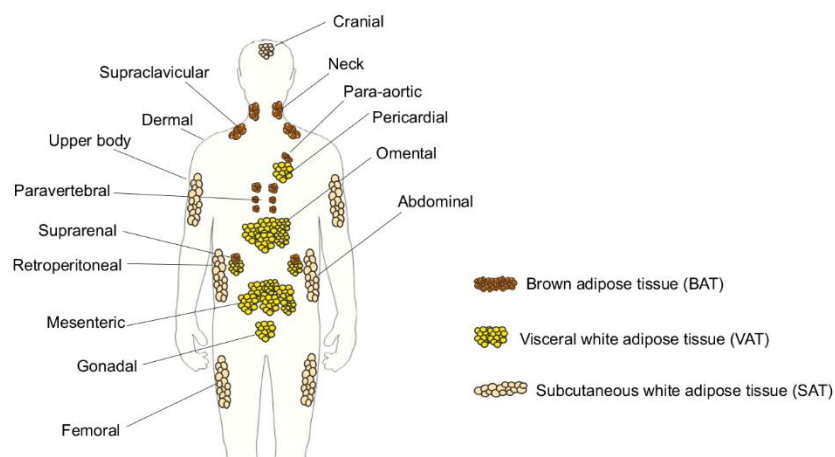


Figura 15. Distribució dels principals dipòsits de teixit adipós blanc i marró en humans (Imatge adaptada de Schoettl et al., 2018).

4.3.3 TIPUS D'OBESITAT EN HUMANS

En humans, malgrat l'IMC és un indicador del grau d'obesitat, el desenvolupament de malalties cardiovasculars està molt influenciat per la localització de l'acumulació de greix.

En funció de la part del cos on es situa l'acumulació de greix dona lloc a l'adipositat perifèrica o a la central. El tipus d'adipositat es classifica utilitzant la relació entre la mesura de la cintura i la del maluc (Piché et al., 2018) (Figura 16):

- **Adipositat perifèrica:** el greix tendeix a acumular-se al teixit adipós subcutani, concretament al dipòsit situat al gluti-femoral. Està associada a un perfil metabòlic favorable i a una protecció cardiovascular ja que protegeix de la lipotoxicitat i allibera menys citocines pro-inflamatòries (Canoy et al., 2007; Tankó et al., 2003).
- **Adipositat central:** el greix s'acumula al teixit adipós visceral i en dipòsits de greix ectòpics situats en òrgans com el fetge, el múscul o el cor. Aquest tipus d'adipositat es relaciona amb l'aparició de problemes metabòlics com la diabetis tipus 2 i un augment en malalties cardiovasculars. Presenta valors elevats en la relació entre la mesura de la cintura i la del maluc (Bays, 2014).

Diversos estudis clínics en humans han demostrat que l'excés de TAV i de greix ectòpic estan associats amb l'aparició de problemes metabòlics (dislipèmia, resistència a la insulina i diabetis de tipus 2) i cardiovasculars, independent de la quantitat total de greix corporal (Fox et al., 2007; Liu et al., 2010).

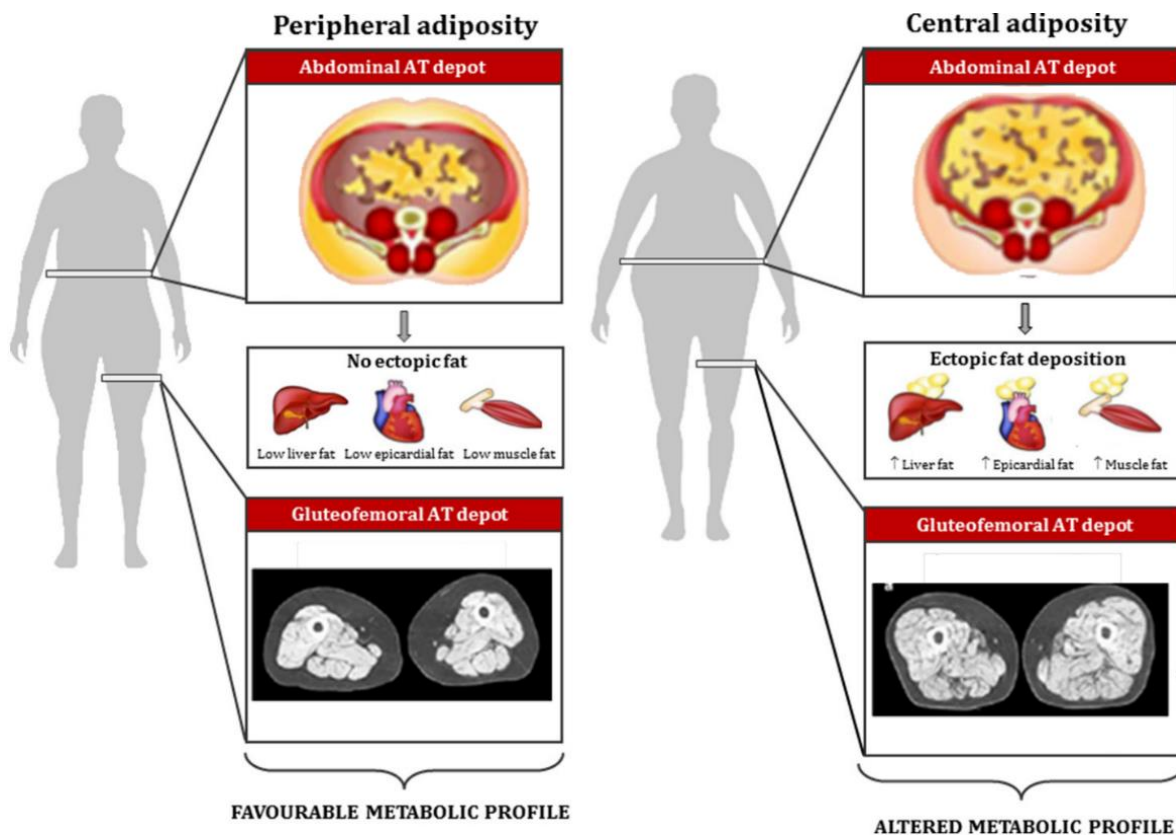


Figura 16. Esquema representatiu dels dos tipus d'obesitat en humans i de les complicacions metabòliques associades. En aquesta figura AT correspon a teixit adipós (imatge adaptada de Piché et al., 2018).

4.3.4 DISFUNCIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS BLANC DURANT L'OBESITAT

L'obesitat provoca canvis a nivell cel·lular i estructural en el teixit adipós. Durant el desenvolupament de l'obesitat, els adipòcits blancs s'expandeixen per emmagatzemar l'excés d'energia en forma de greix. El procés d'expansió pot ser mitjançant la formació de nous adipòcits a partir de preadipòcits (hiperplàsia) o per un augment en la mida dels adipòcits existents (hipertròfia). S'ha descrit que la hiperplàsia dona lloc a un teixit adipós funcional mentre que la hipertròfia dona lloc a un teixit disfuncional associat a problemes metabòlics (Guglielmi and Sbraccia, 2018; Gustafson and Smith, 2015). Estudis amb ratolins sotmesos a una dieta rica en greix (o *High fat diet*; HFD) mostren que el TAV s'expandeix mitjançant hipertròfia dels adipòcits existents. Es creu que en humans el TAV segueix el mateix procés de disfunció. En canvi, el TAS s'associa a un procés d'expansió mitjançant hiperplàsia i no acaba desenvolupant problemes metabòlics (Fuster et al., 2016).

Seguidament en el procés de desenvolupament de l'obesitat, hi ha un augment en el nombre de limfòcits T, B, mastòcits i macròfags tant en models animals com en humans (Cildir et al., 2013). En aquesta situació, els macròfags es polaritzen al fenotip clàssic o M1 de manera que alliberen citocines pro-inflamatòries (TNF α , IL1 β , IL6, MCP1) i augmenten els nivells de ROS produint una inflamació al teixit i a nivell sistèmic (Ludgero-Correia et al., 2012; Ottobelli Chielle et al., 2016). A més a més, la distribució dels macròfags en el teixit també varia ja que en individus control es troben dispersats mentre que en individus amb obesitat es troben agrupats al voltant de les gotes

lipídiques dels adipòcits morts. Diversos estudis han establert una relació entre el nombre d'aquestes estructures formades pels macròfags i la presència d'inflamació i resistència a la insulina en pacients amb síndrome metabòlic (Cinti et al., 2005; Gustafson and Smith, 2015). Paral·lelament, es produeix una disminució de la densitat capil·lar del TAV que genera una situació d'isquèmia i l'activació de les cèl·lules endotelials agreujant la inflamació del teixit. Estudis amb ratolins deficients amb VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor A*) al teixit adipós mostren un augment de la resposta inflamatòria i alteracions a nivells metabòlic (Sung et al., 2013). En humans també s'ha observat una disminució de la vascularització en individus amb obesitat (Figura 17) (Gealekman et al., 2011).

Finalment, el desenvolupament de l'obesitat en els adipòcits va acompanyat d'un augment dels components de la matriu extracel·lular. En aquest cas, hi ha una gran producció de fibres de col·lagen que impediran el correcte funcionament dels adipòcits generant un teixit adipós disfuncional (Figura 17).

Cal mencionar que el teixit adipós també és un òrgan secretor que allibera citocines (leptina, IL-6, resistina o adiponectina) a la circulació sanguínia durant tot aquest procés, les quals tenen un paper modulador a nivell metabòlic i cardíac. També destacar el paper de l'adiponectina ja que l'obesitat en disminueix els seus nivells promovent una situació de resistència a la insulina generalitzada (Fuster et al., 2016; Gustafson and Smith, 2015).

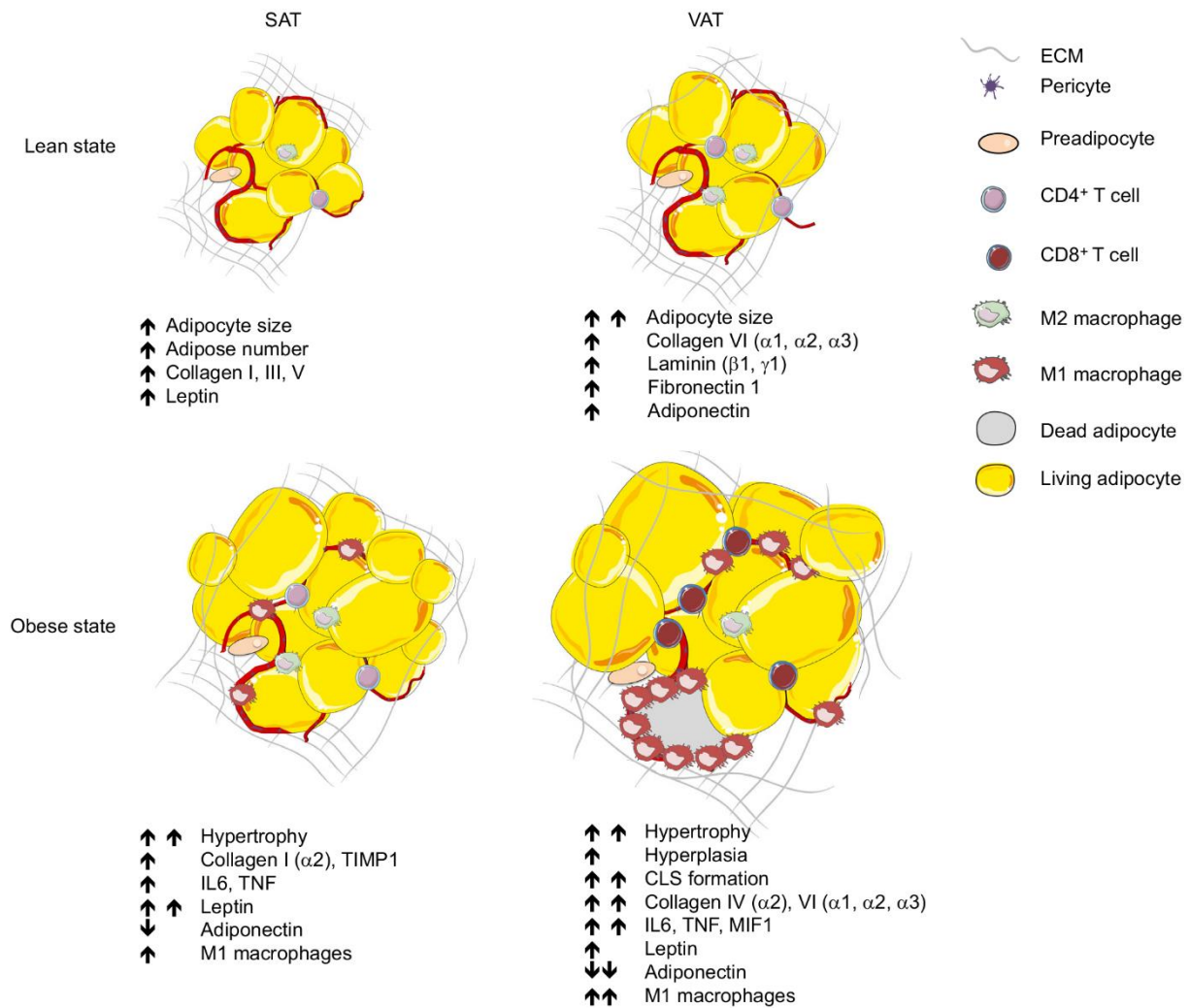


Figura 17. Comportament diferencial del teixit adipós subcutani i el teixit adipós visceral durant l'obesitat. En aquesta figura, SAT correspon a TAS (Teixit adipós subcutani) i VAT correspon a TAV (Teixit adipós visceral). En l'obesitat, el TAV (VAT) presenta una hipertròfia de les seves cèl·lules juntament amb un augment dels macròfags M1 que rodegen adipòcits morts i un augment de la inflamació en comparació al seu estat basal. Per contra, el TAS (SAT) durant l'obesitat també presenta hipertròfia de les seves cèl·lules però amb un augment dels macròfags M2 associats a un perfil anti-inflamatori en comparació al seu estat basal (Schoettl et al., 2018).

4.3.5 DISFUNCIÓ CARDÍACA DURANT L'OBESITAT

L'obesitat dona lloc a afectacions a nivell cardíac provocant un augment en la massa del ventricle esquerre, un allargament de l'aurícula esquerra i alteracions de la funció sistòlica i diastòlica que acaben generant insuficiència cardíaca o infart de miocardi (Lavie et al., 2016). Per contra, altres estudis mostren com pacients amb obesitat però sense complicacions metabòliques, no presenten hipertròfia ni un augment de la massa del ventricle esquerre indicant que el dany cardíac produït per l'obesitat està induït per la disfunció del TAV i no per l'augment de greix en si (Iacobellis et al., 2002). Per tant, els canvis a nivell cardíac són causats bàsicament per la situació d'inflamació i resistència a la insulina generada pel TAV mitjançant l'alliberació de citocines pro-inflamatòries i adipocines a la circulació sanguínia i, potser per l'efecte directe de l'augment del greix ectòpic que rodeja el cor (Figura 18) (Murdolo et al., 2015).

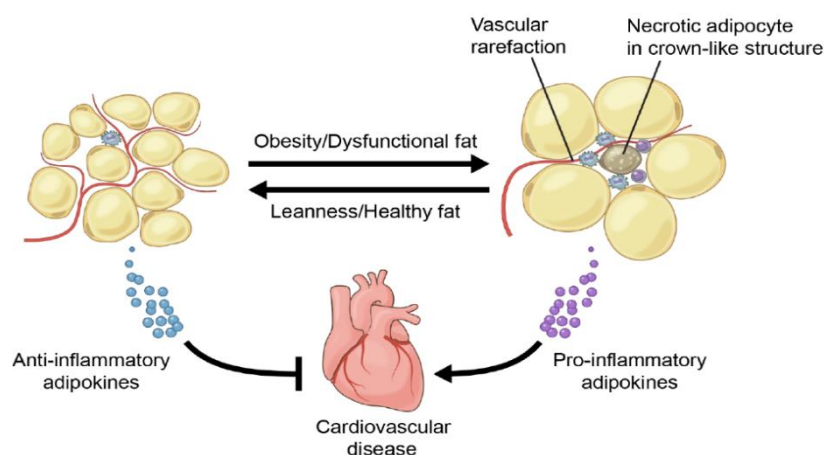


Figura 18. Esquema de la contribució del teixit adipós en la patologia cardíaca durant l'obesitat. En la figura es mostra com l'alliberació d'adipocines pro-inflamatòries per part de TAV durant l'obesitat tenen un efecte advers sobre el cor (Fuster et al., 2016).

Tal i com s'ha comentat, una de les afectacions que pateix el cor durant l'obesitat és la hipertròfia del ventricle esquerre. Concretament, l'obesitat augmenta la probabilitat de desenvolupar-la un 50% (Soteriades et al., 2011). En general, en humans s'ha associat l'obesitat amb una hipertròfia excèntrica però recentment diversos estudis han demostrat que també es pot associar amb una hipertròfia concèntrica. Això contrasta amb el fet que l'obesitat està associada a un augment en el volum sanguini i en el volum de treball del cor on esperaríem una hipertròfia excèntrica amb certa dilatació de la cavitat del ventricle esquerre. Alguns dels factors proposats per explicar la hipertròfia concèntrica en l'obesitat són la presència d'hipertensió en aquests pacients, l'activació del sistema renina-angiotensina, l'estrès oxidatiu, la resistència a la insulina o la presència d'àcids grassos a l'interior dels cardiomiòcits ja que en disminueixen la capacitat de dilatació. Malgrat tot, encara es desconeixen els mecanismes exactes pels qual l'obesitat desencadena hipertròfia (Murdolo et al., 2015).

Anatòmicament associats al cor hi ha dos tipus de dipòsits adiposos: el teixit adipós epicàrdic (TAE) i el teixit adipós pericàrdic (TAP) (Iacobellis and Bianco, 2011). En situacions fisiològiques, el TAE té influència sobre el miocardi i les artèries coronàries exercint un paper cardioprotector ja que aporta l'energia necessària pel seu funcionament. En canvi, en situacions patològiques actuarà com el TAV, alliberant citocines pro-inflamatòries, augmentant l'estrès oxidatiu, reduint la vascularització, disminuint els nivells d'adiponectina, promovent resistència a la insulina i lipotoxicitat al miocardi. Per tant, actua com a desencadenant de patologies cardiovasculars (González et al., 2017). Recentment, s'ha descrit l'expressió gènica d'UCP1 en el TAE suggerint que seria de fet més semblant al TAM que al TAB (Sacks et al., 2009).

4.3.6 TRACTAMENTS

Un dels factors clau per combatre els efectes nocius de l'obesitat és la pèrdua de pes. Quan la disminució de la massa corporal és igual o superior al 5-10% ja es produeix una disminució del risc cardiovascular i una millora de les malalties metabòliques associades com la diabetis tipus 2, la hipertensió o la dislipèmia (Gadde et al., 2018).

Hi ha diferents mètodes per aconseguir la pèrdua de pes:

- **Dieta**

En casos de sobrepès o obesitat lleu es pot aconseguir la pèrdua de pes a través de canvis en l'estil de vida. Consisteixen en incorporar dietes baixes en calories i augmentar l'activitat física. Aquesta metodologia és lenta ja que la disminució de pes és gradual. Un cop assolida la pèrdua de pes, s'ha de ser molt constant per evitar recuperar-lo durant l'etapa de manteniment. Diversos estudis clínics mostren com canvis en l'estil de vida redueixen els riscos cardiovasculars, disminueixen la incidència de diabetis tipus 2 i milloren el control de la glucèmia (Knowler et al., 2002; Pi-Sunyer et al., 2007).

- **Medicació**

El tractament farmacològic es dóna quan els canvis en l'estil de vida no han estat suficients. En l'actualitat, la majoria dels fàrmacs que s'utilitzen actuen incrementant la sensació de sacietat per reduir el consum de calories en la dieta i promovent la despesa energètica. Malgrat tot, han d'anar acompanyats d'una dieta saludable i baixa en greixos. Com que l'obesitat és una malaltia crònica, la medicació s'ha de prendre de forma crònica sempre que no suposi cap risc pel pacient. S'ha de tenir en compte que aquests fàrmacs presenten diversos efectes secundaris (Gadde et al., 2018; Sweeting and Caterson, 2017) (Taula 4).

Fàrmac	Efectes secundaris
Orlistat	Incontinència fecal
Lorcaserin	Mal de cap, mareig, fatiga, nàusees, boca seca, estrenyiment, tos i hipoglucèmia en pacients amb diabetis
Liraglutide	Nàusees, vòmits, diarrea, estrenyiment, mal de cap, fatiga i hipoglucèmia.
Phentermine/toparimate	Parestèsia, mareig, insomni, estrenyiment i boca seca.
Naltrexone/bupropion	Nàusees, vòmits, mal de cap, mareig, insomni, boca seca i diarrea.

Taula 4. Resum dels principals efectes secundaris de la medicació per combatre l'obesitat (Taula adaptada de Gadde et al., 2018).

- **Cirurgia bariàtrica**

Actualment la cirurgia bariàtrica és el millor tractament contra l'obesitat. Consisteix en un procediment quirúrgic que modifica el tracte gastrointestinal per aconseguir una reducció significativa i ràpida del pes corporal. S'aconsella en pacients amb obesitat amb un IMC ≥ 35 i

alguna malaltia associada com la diabetis tipus 2 (Frühbeck, 2015; Kissler and Settmacher, 2013; Neylan et al., 2016). La cirurgia bariàtrica no només actua disminuint el pes corporal sinó que també s'ha vist que reverteix la diabetis tipus 2 i redueix el risc cardiovascular. Recentment, s'ha descrit que la cirurgia bariàtrica també és útil per tractar la diabetis tipus 2 en pacients amb un IMC < 35 (Cummings and Cohen, 2016). També, s'ha descrit que millora la hipertensió i el perfil lipídic circulant (Sjo et al., 2019).

Les cirurgies bariàtriques es poden classificar en:

- **Restrictives:** consisteixen en una disminució de la mida de l'estómac per reduir la ingesta d'aliments.
- **Mal absorptives (o alteracions en l'absorció de nutrients):** consisteixen en modificacions en els intestins provocant la mala absorció de determinats nutrients com lípids o algunes vitamines.
- **Mixtes:** presenten una combinació de característiques de les dues cirurgies bariàtriques anteriors. De manera, que presenten una disminució de la ingesta d'aliments i a la vegada modificacions en l'absorció d'alguns nutrients.

Els procediments quirúrgics més habituals són: (Figura 19)

- **Bypass gàstric (Roux-en-Y gastric bypass):** és el més utilitzat. Consisteix en una reducció de la mida de l'estómac que es connecta amb la part mitja de l'intestí o jejú. Per altra banda, la part sobrant de l'estómac es deixa i la part inicial de l'intestí o duodè es connecten amb el jejú. D'aquesta manera es redueix la ingesta i es limita l'absorció de nutrients ja que els aliments ingerits no passaran pel duodè. A més a més, els sucus gàstrics secretats per la part sobrant de l'estómac i el duodè ajuden a la digestió un cop arriben al jejú.
- **Gastrectomia de màniga (Sleeve gastrectomy o LSG):** consisteix en una reducció de l'estómac. La dissecció es fa al llarg de tota la curvatura de l'estómac deixant intactes els intestins. En aquest cas, la part sobrant de l'estómac s'elimina.
- **Banda gàstrica:** consisteix en una banda cilíndrica de silicona amb un manguito inflable connectat a un tub de silicona a través del qual es pot ajustar la mida del manguito injectant solució salina. Es col·loca a l'entrada de l'estómac i es pot ajustar en funció de cada pacient. Actua restringint la quantitat de menjar ingerida.
- **Derivació biliopancreàtica:** actualment està en desús. Consisteix en una reducció de l'estómac que es connecta a la part final de l'intestí prim o ili. La digestió es fa al còlon on es barregen els sucus digestius pancreàtics i la bilis, tot i que els nutrients no seran absorbits (Kissler and Settmacher, 2013).

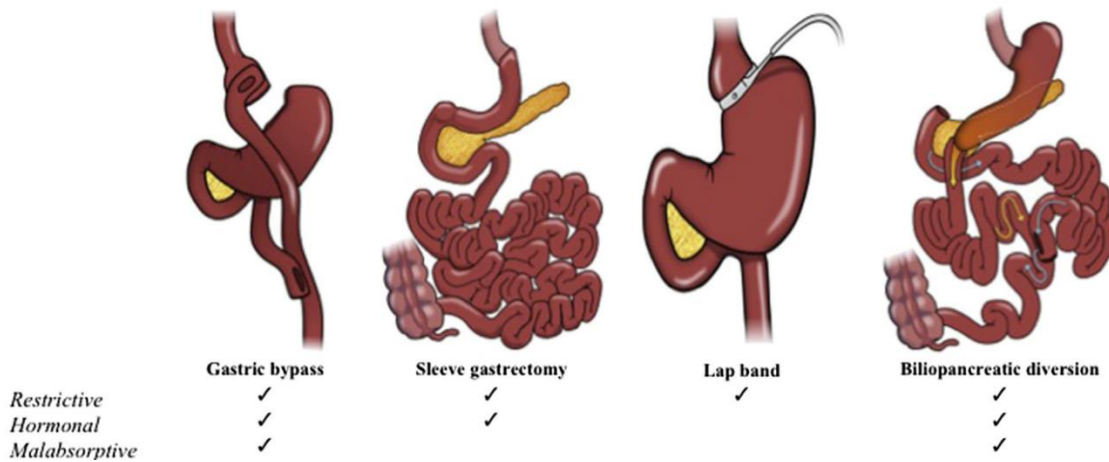


Figura 19. Representació dels diferents tipus de cirurgies bariàtriques i les seves característiques (Neylan et al., 2016).

Malgrat la cirurgia bariàtrica és la millor opció per combatre l'obesitat i la diabetis, cada tipus de cirurgia presenta uns efectes diferents. En general, les tècniques mixtes són més eficients que les restrictives.

Recentment, ha aparegut també el concepte de "cirurgia metabòlica" que s'associa als efectes beneficiosos de la cirurgia bariàtrica per tractar la diabetis tipus 2 i altres malalties associades a l'obesitat més enllà de la pèrdua de pes. Estudis clínics han demostrat que l'efecte de la cirurgia bariàtrica és molt més efectiu que el tractament farmacològic per la diabetis tipus 2 (Schauer et al., 2017). La millora metabòlica es veu als pocs dies de la cirurgia bariàtrica i s'estabilitza al cap d'un o dos anys. En general, els criteris usats per determinar la reversió de la diabetis tipus 2 són els nivells de glicèmia i d'hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}). Després de la cirurgia s'observa una disminució d'aquests paràmetres indicant que s'ha recuperat la homeòstasi de la glucosa (Schlottmann et al., 2018).

En aquestes cirurgies, el ritme de pèrdua de pes durant el primer mes serveix com a indicador de si funcionaran o no. Els efectes protectors de la cirurgia bariàtrica són deguts a un efecte directe sobre la pèrdua de pes que permet revertir problemes respiratoris o la degeneració en les articulacions i per altra banda, a un efecte metabòlic i neurohormonal degut a un canvi hormonal a nivell gàstric i d'adipocines en el teixit adipós. També produeixen alteracions en la via de senyalització dels àcids biliars i en la microbiota. En conjunt, la cirurgia bariàtrica produeix una reducció de la resistència a la insulina, una millora en les patologies del síndrome metabòlic i disminueix la inflamació i l'estrès oxidatiu (Cummings and Cohen, 2016; Frühbeck, 2015; Poitou et al., 2015; Tremaroli et al., 2015).

Es creu que la cirurgia bariàtrica també actua sobre el teixit adipós marró. En humans, s'ha vist que al exposar pacients sotmesos a una cirurgia bariàtrica al fred, augmenta l'activitat del TAM respecte abans de la cirurgia (Vijgen et al., 2012) (Figura 20). En un altre estudi, confirmen l'activació del TAM després de la cirurgia bariàtrica i mostren que aquesta activació després del fred és independent de l'acció hipotalàmica, a diferència dels models animals. Finalment,

demostren l'augment de l'expressió gènica i proteica de marcadors de TAM després de la cirurgia (Rachid et al., 2015). L'activació del TAM després de la cirurgia bariàtrica també es detecta a temperatura ambient i s'ha relacionat amb la disminució de la resistència a la insulina (Dadson et al., 2018). Hui et al, no descriuen diferències en el volum del TAM abans i després de la cirurgia, a diferència del teixit adipós abdominal que si que es redueix dràsticament (Hui et al., 2019). Tots els estudis de TAM en humans s'han realitzant en el dipòsit supraclavicular. També s'ha vist que la implantació d'adipòcits beix humans millora la glicèmia en ratolins sotmesos a una HFD (Min et al., 2016). Tenint en compte tot això, i que s'ha aconseguit activar el TAM d'individus sans mitjançant fàrmacs d'agonistes β -adrenèrgics pren rellevància la importància del *browning* i del BAT en humans front a l'obesitat (Min et al., 2016).

Finalment, estudis clínics en humans demostren com la cirurgia bariàtrica disminueix de forma considerable la incidència de malalties cardiovasculars a llarg termini (Beamish et al., 2016).

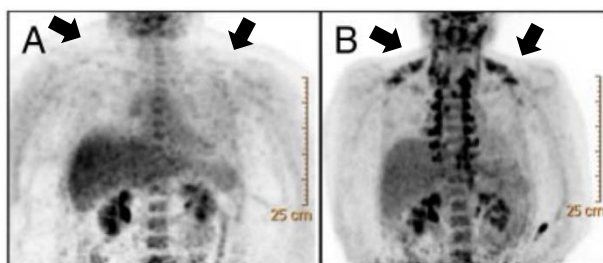


Figura 20. Activitat del teixit adipós marró abans i després de la cirurgia bariàtrica. Les fletxes indiquen el teixit adipós marró supraclavicular. A: Imatge PET CT Scan d'un pacient amb obesitat mòrbida abans de la cirurgia bariàtrica B: després de la cirurgia bariàtrica i la conseqüent pèrdua de pes. S'observa com la disminució de pes corporal indueix la captació de glucosa en el teixit adipós marró com a mostra de l'activació del teixit (Imatge adaptada de Vijgen et al., 2012).

5. FIBROBLAST GROWTH FACTORS

5.1 FAMÍLIA DELS FGFs

Els FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) pertanyen a una àmplia família de factors de creixement que es troben en una gran diversitat d'organismes. Es van descriure l'any 1939 (Trowell and Willmer, 1939) tot i que no van ser aïllats de cervell o de glàndules pituïtàries fins gairebé quatre dècades més tard (Gospodarowicz, 1974).

Es caracteritzen per un domini conservat d'uns 120 aminoàcids malgrat que la mida final de la seqüència d'aminoàcids pot variar entre 17 KDa i 34 KDa (Goetz et al., 2007; Popovici et al., 2005).

Els FGFs interaccionen amb les proteïnes de membrana FGFR (*Fibroblasts Growth Factors Receptors*) per tal d'activar la senyalització cel·lular. En el cas del FGFs paracrins també presenten afinitat per l'heparan sulfat (HS) que actua com a cofactor, estabilitzant la unió FGF-FGFR i determinant el lloc d'acció. En canvi, els FGFs endocrins necessiten les proteïnes de la família Klotho com a cofactor (Kuro-o, 2008).

El paper dels FGFs varia en les diferents etapes de la vida. Durant el desenvolupament tenen un paper fonamental en la embriogènesis. En canvi, en l'etapa adulta estan implicats en altres processos a nivell de metabolisme, homeòstasis i reparació de teixits o regulació cel·lular (Popovici et al., 2005).

En vertebrats, s'han descrit 22 membres malgrat la numeració dels FGFs arriba fins al 23 (FGF1-FGF23). Això és degut a que FGF19 és l'ortòleg humà de Fgf15 en ratolí. Malgrat això, cal destacar que les subfamílies de ratolí i humans són idèntiques (Itoh and Ornitz, 2008). Pel què fa a la distribució dels FGFs es troben dispersos al llarg del genoma avalant les hipòtesis de que han patit processos de duplicacions i translocacions al llarg de l'evolució (Itoh and Ornitz, 2004).

5.1.1 CLASSIFICACIÓ FUNCIONAL FGFs

Els FGFs es distribueixen en 7 subfamílies basant-se en criteris filogenètics, bioquímics i en l'homologia de les seves seqüències d'aminoàcids (Figura 21) (Itoh and Ornitz, 2004; Oulion et al., 2012).

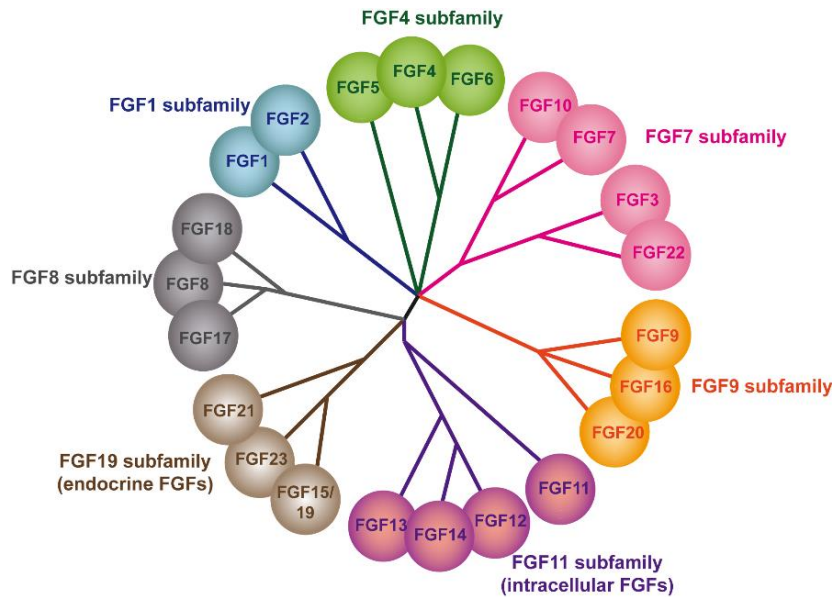


Figura 21. Esquema de les subfamílies de FGFs basant-se en la filogènia (Maddaluno et al., 2017).

Segons el seu mecanisme d'acció es classifiquen en tres grups:

- **Intracrins:** Comprèn la subfamília FGF11. Es caracteritzen perquè no interaccionen amb els FGFR per a la senyalització cel·lular. S'ha descrit que interaccionen amb canals de sodi dependents de voltatge i amb altres receptors que activen la via MAPK (Itoh and Ornitz, 2008). Estudis realitzats amb animals deficientes (-/-) per aquests factors presenten alteracions a nivell neuronal (Itoh and Ornitz, 2011). També s'ha descrit que estan implicats en el tràfic cel·lular a través de microtúbuls (Fon Tacer et al., 2010).
- **Paracrins/Autocrins:** Comprenen les subfamílies FGF1, FGF4, FGF7, FGF8 i FGF9. Presenten una seqüència N-terminal a través de la qual es talla el pèptid i es secreta a l'exterior cel·lular amb l'ajuda de xaperones. Es caracteritzen perquè interaccionen amb els FGFR i el cofactor heparan sulfat per a la senyalització cel·lular. Al presentar una gran afinitat per l'heparan sulfat situat a la membrana cel·lular actuen al voltant o a la mateixa cèl·lula que els secreta (Ornitz and Itoh, 2015). Estudis realitzats amb animals deficientes per aquests factors mostren el seu paper a nivell de desenvolupament (Itoh and Ornitz, 2011). Alguns FGFs poden actuar directament al nucli com a factors de transcripció actuant de forma autocrina (Itoh and Ornitz, 2011).
- **Endocrins:** Comprèn la subfamília FGF15/19. Es caracteritzen per una seqüència senyal situada a l'extrem N-terminal per la qual es talla el pèptid i es secreta fora de la cèl·lula (Itoh and Ornitz, 2004). Al presentar una baixa afinitat per l'heparan sulfat poden marxar del lloc de secreció actuant com a hormones. Això ha fet que també es coneguin com a *hormone-like*. Necessiten la presència de les proteïnes de la família Klotho com a cofactor per estabilitzar la unió amb el FGFR i determinar el seu lloc d'acció (Fon Tacer et al., 2010). Els FGFs endocrins només s'han identificat en vertebrats mentre que els altres grups es troben tant en invertebrats com en vertebrats (Itoh, 2010). Estudis en ratolins han demostrat que aquest grup de FGFs presenta diferents papers en funció de l'edat. En els

primers estadis estan implicats en el desenvolupament, en canvi en adults realitzen funcions a nivell metabòlic (Itoh and Ornitz, 2011).

5.1.2 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS DELS FGFs

Els FGFs presenten un nucli conservat de 120 aminoàcids plegats en una estructura de β -trèvol (*β -trefoil*). Els FGFs paracrins presenten una estructura del nucli conservat en forma de β -trèvol regular i formada per 12 làmines β antiparal·leles (β 1- β 12). En canvi, els FGFs endocrins només presenten 11 làmines β antiparal·leles ja que han perdut la regió entre β 10 i β 12. Aquest nucli conservat es troba envoltat de seqüències d'aminoàcids diferents que atorgaran les diferències entre els diferents membres de la família. En els FGFs paracrins la regió entre les cadenes β 1- β 2 i β 10- β 12 conforma el lloc d'unió a l'hèparan sulfat. Precisament, els FGFs endocrins han perdut la regió β 10- β 12 explicant la seva baixa afinitat per l'hèparan sulfat (Figura 22) (Goetz et al., 2007).

Dins del grup dels FGFs endocrins, s'ha descrit que FGF21 (*Fibroblast growth factor 21*) presenta l'estructura de 120 aminoàcids plegats en una estructura β -trèvol i unes regions C-terminal i N-terminal amb funcions molt diferenciades. L'extrem C-terminal és important per la unió amb el cofactor β -Klotho (KLB) mentre que l'extrem N-terminal és important per la activació dels FGFR i la transducció del senyal (Yie et al., 2009).

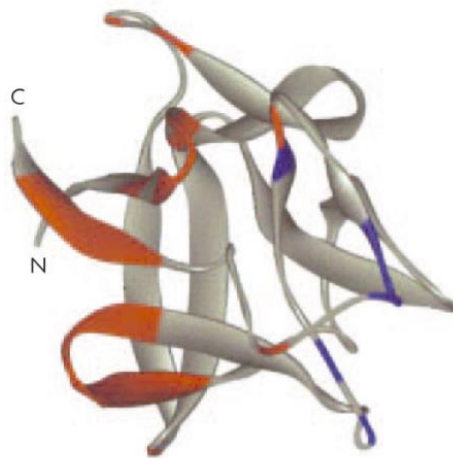


Figura 22. Esquema de l'estructura de plegament característica dels FGFs. Les zones vermelles corresponen a la zona d'unió al receptor i les blaves a les d'unió a l'hèparan sulfat (Mason, 2007).

5.1.3 SENYALITZACIÓ CEL·LULAR DELS FGFs

5.1.3.1 Receptors dels FGFs

Els FGFs actuen a través de la unió amb els FGFR que estan codificats per 4 gens (FGFR1, FGFR2, FGFR3 i FGFR4) (Goetz et al., 2007). Són proteïnes que es caracteritzen per tres dominis: un extracel·lular, un transmembrana i un intracel·lular del tipus tirosina quinasa que s'encarrega de la transducció del senyal. El domini extracel·lular conté 3 dominis *immunoglobulin like* (D1-D3). Els dominis D2 i D3 s'encarreguen de la unió específica amb el lligand. El domini D2 també té un domini d'unió a l'hèparan sulfat (Fon Tacer et al., 2010). La presència de l'hèparan sulfat és

necessària per establir la unió FGF-FGFR. Un cop establitzat aquest dímer, el receptor s'activarà mitjançant la fosforilació d'un determinat residu de tirosina que desencadenarà la cascada de senyalització a l'interior de la cèl·lula (Itoh and Ornitz, 2004, 2008). En el cas dels FGFs endocrins enlloc de l'heparan sulfat es necessita el cofactor de la família Klotho per establir la unió FGF-FGFR tal i com s'ha descrit anteriorment.

Els gens que codifiquen pels receptors també han patit dos etapes de duplicacions genòmiques que han permès la seva diversificació. En aquest cas, destaca concretament un procés d'*splicing* alternatiu del domini D3 que ha generat les isoformes 'b' i 'c' (Itoh and Ornitz, 2004; Johnson et al., 1991). Aquest *splicing* alternatiu es dona als gens que codifiquen pels receptors FGFR1, FGFR2 i FGFR3 donant lloc a FGFR1b, FGFR1c, ... (Figura 23). Aquesta modificació amplia el nombre de receptors a set variants i permet diversificar i augmentar la especificitat de lligand i de teixit en els receptors (Fon Tacer et al., 2010).

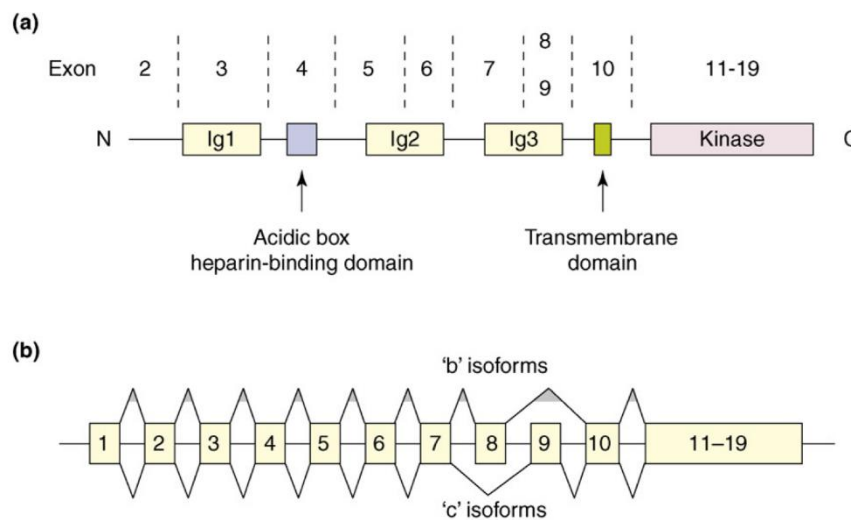


Figura 23. (a) Esquema de l'estructura dels FGFR. (b) Representació de l'*splicing* alternatiu dels FGFR que dona lloc a les isoformes 'b' i 'c' (Kuro-o, 2008).

Tal i com s'ha comentat, cada membre de la família dels FGFs interacciona amb uns determinats receptors i coreceptors donant lloc a diferents especificitats de teixit i acció (Fon Tacer et al., 2010). La taula 5 mostra l'especificitat de receptor dels FGFs.

	Subfamília	FGF	FGFR1b	FGFR1c	FGFR2b	FGFR2b	FGFR3b	FGFR3c	FGFR4
Paracrins	FGF1	FGF1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		FGF2	++	+++	-	++	-	+++	+++
	FGF4	FGF4	-	+++	-	+++	-	++	+++
		FGF5	-	++	-	+	-	-	-
		FGF6	-	++	-	++	-	-	+++
	FGF7	FGF3	++	-	++	-	-	-	-
		FGF7	-	-	+++++	-	-	-	+
		FGF10	++	-	+++++	-	-	-	-
		FGF22	++	-	+++++	-	-	-	-
	FGF8	FGF8	-	++	-	+++	+	+++++	++++
		FGF17	-	+	-	+	-	+++	+++
		FGF18	-	-	-	+	-	++	++
	FGF9	FGF9	-	-	-	++	++	+++	-
		FGF16	-	-	-	+	-	+	-
		FGF20	-	+	-	++	++	+++	+
Intracrins	FGF11	FGF11	-	-	-	-	-	-	-
		FGF12	-	-	-	-	-	-	-
		FGF13	-	-	-	-	-	-	-
		FGF14	-	-	-	-	-	-	-
Endocrins	FGF19	FGF15/19	-	+++	++	+++++	+	++++	+++++
		FGF21	+	+	+++	+++	+	+	++++
		FGF23	-	+	++	+++	+	++	+++++

Taula 5. Taula d'especificitat dels FGFs pels seus receptors (Taula adaptada de Mason, 2007).

5.1.3.2 Interacció amb l'heparan sulfat

L'heparan sulfat és molt abundant i es troba localitzat a les membranes cel·lulars i a la matriu extracel·lular, determinant el lloc d'acció dels FGFs. Quan l'afinitat per l'heparan sulfat és molt gran la seva acció es centrarà al voltant de les cèl·lules que secreten els FGFs donant lloc a una funció autocrina o paracrina. En canvi, quan presenten una baixa afinitat pel grup heparan sulfat els FGFs podran entrar a la circulació sanguínia i actuar lluny del lloc on s'han sintetitzat donant lloc a una funció endocrina (Goetz and Mohammadi, 2013; Itoh and Ornitz, 2008). A més a més, la interacció dels FGFs amb l'heparan sulfat també és important ja que permet augmentar el temps de vida mig dels FGFs protegint contra la proteòlisi o la desnaturalització tèrmica. (Itoh and Ornitz, 2004). Actua com a cofactor ja que és necessari per la formació del complex FGF-FGFR i, la posterior transducció de senyal.

5.1.3.3 Cofactors Klotho

Com ja s'ha comentat anteriorment, els FGFs endocrins necessiten la presència d'una proteïna de la família Klotho com a cofactor. Aquesta família està formada per tres membres: α , β , *lactase like* o també anomenat γ Klotho (Itoh and Ornitz, 2008). Pertanyen a la família de les 1β -glucosidases. A nivell estructural presenten dos dominis β -glucosilases-like en els membres α i β -Klotho, un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica curta (Goetz and Mohammadi, 2013). Cada membre s'expressa en uns teixits diferents atorgant l'especificitat d'acció als FGFs endocrins (Kurosu et al., 2007). S'ha descrit que α -klotho (o Klotho) interacciona amb FGF23 i β -

klotho amb FGF19 i FGF21 (Fon Tacer et al., 2010; Goetz and Mohammadi, 2013; Kuro-o, 2008). Estudis *in vitro* han confirmat la interacció de FGF21 i β -Klotho. S'ha descrit que la transfecció i sobreexpressió de β -Klotho permet activar la via de senyalització de FGF21 en fibroblasts. A més a més, mitjançant tècniques d'immunoprecipitació s'ha obtingut evidències de la formació del complex FGF21- β -klotho, que estabilitza i permet la posterior unió amb els FGFRs. Per altra banda, el bloqueig de l'expressió de β -klotho mitjançant siRNA produeix la pèrdua de senyalització de FGF21 (Yie et al., 2009). Estudis *in vivo* també han demostrat que animals β -klotho $-/-$ perden la senyalització de FGF21 (Ding et al., 2012; Ogawa et al., 2007).

β -Klotho s'expressa principalment en fetge, teixit adipós blanc, teixit adipós marró, còlon i pàncrees limitant així l'acció de FGF19 i FGF21 a determinats teixits (Fon Tacer et al., 2010; Kurosu et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Suzuki et al., 2008).

5.1.3.4 Dimerització del receptor i mecanisme d'acció

La interacció del lligand amb el receptor causa la dimerització del receptor. En els FGFs paracrins el complex FGF-FGFR-HS és estable quan la relació és 2:2:2 (Goetz and Mohammadi, 2013). En canvi, en els FGFs endocrins el complex FGF-FGFR- β -Klotho és més estable quan la relació és 1:2:1. El canvi conformacional del receptor després de la dimerització en ambdós casos permet la fosforilació del residu de tirosina que desencadena l'activació de diverses vies de transducció del senyal. El senyal es pot transmetre per dos mecanismes diferents. En primer lloc, la tirosina fosforil·lada pot reclutar proteïnes adaptadores que provocaran fosforilacions en cadena ampliant la senyalització i, en segon lloc pot unir-se directament a factors de transcripció. Les principals vies de senyalització que s'activen són RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) i PKC que actuen promovent la supervivència cel·lular, la proliferació cel·lular i l'angiogènesis respectivament (Figura 24). També s'activa la via de STAT (Ornitz and Itoh, 2015). Finalment, el complex FGF-FGFR serà internalitzat a l'interior cel·lular on es degradarà per part dels lisosomes o bé simplement serà inactivat mitjançant poliubiquinitzacions (Porta et al., 2017; Tiseo et al., 2015).

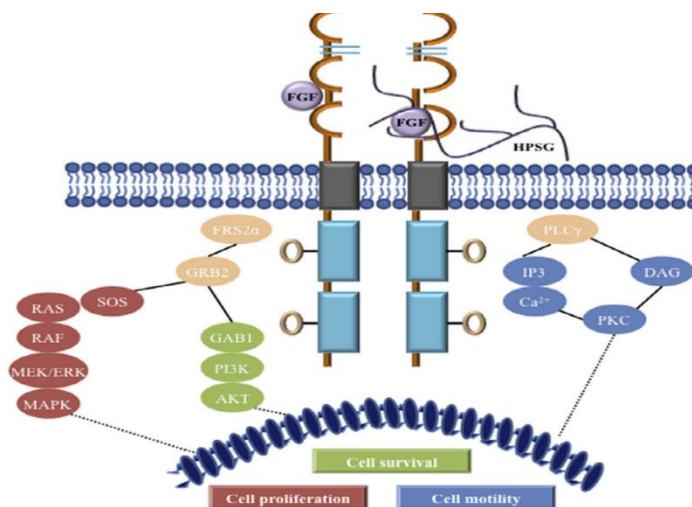


Figura 24. Activació de la cascada de senyalització intracel·lular deguda al complex FGF-FGFR-HS (Tiseo et al., 2015).

5.2 FGFs ENDOCRINS

Com s'ha descrit anteriorment, els FGFs endocrins es caracteritzen per actuar com a hormones que s'uneixen a un FGFR i a un cofactor de la família Klotho. Engloba la subfamília FGF15/19 que conté tres membres: FGF23, FGF15/19 i FGF21. Cada membre presenta afinitat per uns receptors (FGFR1-FGFR4) o cofactors (Klotho, α -Klotho i β -Klotho) diferents determinant el seu lloc d'acció i la seva funció. Tenen un paper crucial en el manteniment de la homeòstasi metabòlica ja que estan implicats en la regulació dels àcids biliars, metabolisme de la glucosa i dels lípids i metabolisme de la vitamina D i fòsfats (Figura 25). Degut al seu ampli espectre d'accions estan relacionats amb una gran quantitat de malalties en humans com l'obesitat, la diabetis tipus 2, el càncer, problemes renals o cardiovasculars (Degirolamo et al., 2016).

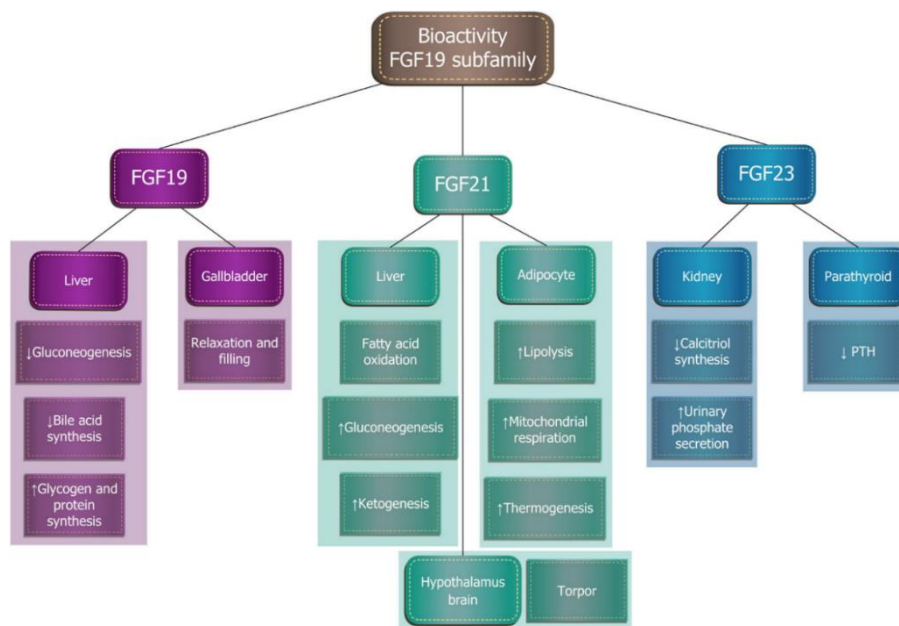


Figura 25. Efectes biològics dels membres de la subfamília FGF15/19 (Dolegowska et al., 2019).

A partir d'ara ens centrarem en el paper metabòlic de FGF21 ja que és el membre amb el qual es treballa en aquesta tesi.

5.2.1 FGF21

FGF21 es va identificar fa dues dècades en ratolí. Es va classificar dins de la família dels FGFs degut a la seva homologia en les seqüències d'aminoàcids. És una proteïna secretable formada per 209 aminoàcids. Al igual que la resta de FGFs, s'ha identificat en humans on presenta un 75% d'homologia en la seqüència d'aminoàcids respecte la de ratolí i un 35% de similitud amb la de FGF19 (Nishimura et al., 2000). L'interès en FGF21 va tenir un important impuls en descobrir-se el 2005 que podia tenir un potent efecte anti-diabètic (Kharitononkov et al., 2005).

S'expressa en fetge, pàncrees, testicles, tracte gastrointestinal, teixit adipós blanc i marró, múscul, sistema nerviós central i cor (Itoh, 2010; Staiger et al., 2017). La seva expressió s'indueix per situacions d'estrès o patologies com dejunis prolongats, dietes cetogèniques, dietes riques en hidrats de carboni, alteracions mitocondrials a nivell muscular, hipertròfia cardíaca,

pancreatitis, etc (Degirolamo et al., 2016; Itoh, 2014).

5.2.1.1 EFECTES FISIOLÒGICS DE FGF21 EN ELS TEIXITS

5.2.1.1.1 FGF21 en el fetge

El fetge és un dels teixits amb una major expressió i secreció de FGF21 de manera que la seva contribució als nivells circulants és molt rellevant.

El dejuni és un dels principals inductors de FGF21 en el fetge. En aquesta situació hi ha un augment d'àcids grassos procedents del teixit adipós que activaran PPAR α formant un complex amb RXR (*Retinoid X receptor*). Aquest complex entra al nucli on s'uneix al promotor de FGF21 augmentant-ne la seva expressió i secreció. La funció de FGF21 en aquest teixit és augmentar l'oxidació dels àcids grassos circulants en el fetge i generar i subministrar cossos cetònics com a font d'energia a altres teixits. Si el dejuni es prolonga activarà la gluconeogènesi a través del coactivador PGC1 α (Badman et al., 2007).

En l'obesitat i el síndrome metabòlic també es produeix un augment de l'expressió i secreció de FGF21 degut a l'acumulació d'àcids grassos en el fetge. Aquesta patologia hepàtica s'anomena fetge gras no alcohòlic (NAFLD) però si es cronifica acaba produint mort cel·lular, inflamació i fibrosis hepàtica donant lloc a l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH). S'ha descrit que FGF21 d'una banda s'indueix en resposta a NAFLD i a més protegeix contra l'aparició de NAFLD o NASH en ratolins obesos afavorint l'oxidació dels àcids grassos a nivell hepàtic i amb efectes directes sobre la inflamació i la fibrosis hepàtica (Maratos-Flier, 2017). En humans, els nivells circulants de FGF21 també es troben augmentats en pacients amb NAFLD i de fet s'utilitza FGF21 com a biomarcador d'aquesta patologia (Li et al., 2010).

A continuació s'exposaran els efectes hepàtics de FGF21 en una de les patologies d'estudi en aquesta tesi.

Efectes de FGF21 en l'alcoholisme

El consum crònic d'alcohol està associat a l'aparició del fetge gras associat a l'alcohol (AFL). Al igual que en el NAFLD o el NASH, FGF21 actua protegint contra el fetge gras associat al consum d'alcohol. La ingesta aguda o crònica d'alcohol incrementa l'expressió gènica de FGF21 en fetge i els seus nivells circulants tant en ratolins com en humans. Gràcies a la utilització de models animals, s'ha descrit que FGF21 protegeix el fetge disminuint la lipogènesi, augmentant l'oxidació d'àcids grassos, reduint la inflamació i l'estrès oxidatiu a través de l'activació de la via de senyalització d'AMPK (Liu et al., 2016; Zhu et al., 2014a). A més a més, PPAR α segueix sent l'encarregat de controlar l'expressió de FGF21 ja que els ratolins PPAR α -/- presenten major dany hepàtic induït per l'alcohol (Chen et al., 2017).

Recentment, han sorgit dos estudis en humans on es descriu que la ingesta aguda d'alcohol produeix un pic en els nivells circulants de FGF21 que després recupera de nou els nivells basals. Els dos estudis discrepen en el moment del pic (120 minuts o 6 hores) però això podria ser degut a que no utilitzen la mateixa dosis d'alcohol. Aquest pic no coincideix amb el pic d'etanol en sang indicant que FGF21 no actua sobre el metabolisme de l'alcohol (Desai et al., 2017; Søbberg et al.,

2018). També s'ha fet un seguiment de diversos participants al festival de l'*Octoberfest*, i s'observa el mateix patró ja que els nivells circulants de FGF21 augmenten després de tres dies ingerint elevats nivells d'alcohol però es recuperen els nivells basals a les tres setmanes (Søberg et al., 2018). En canvi, els nivells circulants de FGF21 en pacients amb dany hepàtic associat a l'alcoholisme es mantenen elevats (Liu et al., 2016).

5.2.1.1.2 FGF21 en el teixit adipós blanc

L'expressió de FGF21 en el TAB està regulada per PPAR γ en resposta als àcids grassos (Muisse et al., 2008; Wang et al., 2015) i actua afavorint el consum de glucosa, augmentant la despesa energètica i millorant la sensibilitat a la insulina (Coskun et al., 2008).

La primera evidència de l'acció de FGF21 en el TAB va ser *in vitro*. Es va descriure que el tractament d'adipòcits 3T3L1 amb FGF21 promou un augment de la utilització de la glucosa degut a la inducció del transportador de glucosa GLUT1, independent de la acció de la insulina (Ge et al., 2011). Estudis amb ratolins que sobreexpressen FGF21 mostren resistència a l'augment de pes corporal després d'una HFD (Kharitonov et al., 2005). D'altra banda, el tractament de ratolins amb FGF21 després d'una HFD o en models d'obesitat provoca una reducció del pes corporal i la millora del perfil metabòlic (Coskun et al., 2008; Sarruf et al., 2010). Un altre estudi realitzat en primats diabètics, valida el paper de FGF21 com a regulador metabòlic. Aquests autors descriuen una disminució de la glucèmia, una millora del perfil lipídic i una lleugera disminució de pes corporal en aquests primats tractats amb FGF21 (Kharitonov et al., 2007). Malgrat els estudis anteriors, l'any 2010 Fisher et al. van descriure l'obesitat com un estat de resistència a FGF21, on coexisteixen nivells elevats de FGF21 però una manca del seu efecte biològic saludable sobre el metabolisme (Fisher et al., 2010).

5.2.1.1.3 FGF21 en el teixit adipós marró

FGF21 té un paper molt important en la regulació de la temperatura corporal en resposta al fred que es dona en el TAM. La termogènesis es produeix per l'acció d'UCP1 que permet desacoblar la cadena respiratòria generant calor enlloc d'energia. Ratolins exposats al fred presenten una inducció de FGF21 en el TAM com a resposta a la senyalització β -adrenèrgica desencadenada pel fred (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares et al., 2011). Aquest increment de FGF21 exerceix un efecte autocrí/paracrí augmentant la captació de glucosa i la lipòlisis en el teixit. També produeix un augment en la expressió de PGC1 α que ajudarà a la biogènesis i funció mitocondrial (Fisher and Maratos-Flier, 2016). Totes aquestes accions preparen al teixit per dur a terme la producció de calor. D'altra banda, el TAM és diana dels efectes del FGF21 sistèmic augmentant la seva activitat termogènica (Hondares et al., 2011).

Quan l'exposició al fred es prolonga, FGF21 no només actua al TAM sinó que també al TAB promovent el procés de *browning*. Durant aquest procés el TAB deixa de ser un teixit d'emmagatzematge de lípids i adquireix característiques del TAM com l'expressió de UCP1 i PGC1 α per dur a terme la producció de calor (Fisher and Maratos-Flier, 2016; Giralte et al., 2015).

5.2.1.1.4 FGF21 en el múscul

El múscul és un òrgan productor i secretor de FGF21 en condicions d'estrès muscular. Diversos estudis han demostrat com el dany mitocondrial en el múscul indueix l'expressió de FGF21 i, seguidament de PGC1 α per tal d'augmentar la biogènesis mitocondrial. En conseqüència, els nivells circulants de FGF21 també es troben augmentats en situacions de dany mitocondrial (Ribas et al., 2014). De fet, FGF21 s'ha proposat com a possible biomarcador de patologies mitocondrials o alteracions del genoma mitocondrial tant en models de ratolins com en humans (Itoh, 2014; Lehtonen et al., 2016; Li et al., 2017).

Finalment, també s'ha descrit l'efecte directe de FGF21 sobre les cèl·lules musculars promovent la utilització de glucosa i la sensibilització a la insulina (Izumiya et al., 2008), tot i que aquests efectes no s'han pogut reproduir *in vivo*.

5.2.1.1.5 FGF21 en el pàncrees

El pàncrees presenta una elevada expressió de FGF21. La seva funció en aquest òrgan és protegir contra la inflamació i el dany provocat per la pancreatitis. S'ha identificat Mist1 com el factor de transcripció inductor de FGF21 en aquest teixit (Coate et al., 2017; Fisher and Maratos-Flier, 2016).

Una altra funció de FGF21 al pàncrees és protegir contra la diabetis. El tractament de ratolins diabètics amb FGF21 protegeix les cèl·lules β pancreàtiques contra l'apoptosis i augmenta la secreció d'insulina (Wente et al., 2006). Recentment, també s'ha descrit que FGF21 protegeix el pàncrees exocrí contra l'estrès de reticle estimulant la secreció d'enzims digestius a nivell autocrí/paracrí que eviten l'acumulació de proteïnes danyades (Coate et al., 2017).

5.2.1.1.6 FGF21 en el sistema nerviós central

FGF21 és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica i arribar al cervell. A més, també s'ha detectat l'expressió de FGFR1, FGFR2, FGFR3 i β -Klotho en el cervell (Bookout et al., 2013; Fisher and Maratos-Flier, 2016). L'expressió de β -Klotho, s'ha detectat concretament en àrees del cervell implicades en l'eix hipotàlem-hipòfisis-glàndules suprarenals i l'eix hipotàlem-hipòfisis gonadal (Bookout et al., 2013; Fon Tacer et al., 2010). Un augment en els nivells de FGF21 en el cervell activarà el seu receptor a l'hipotàlem promovent l'alliberació d'hormones. Aquestes hormones hipotalàmiques actuaran sobre altres zones del cervells implicades en els eixos anteriors promovent l'alliberació d'altres factors i hormones que finalment actuaran en els teixits perifèrics desencadenant respostes fisiològiques o patològiques. Entre totes les accions que controla l'hipotàlem ens centrarem en el control de la pressió arterial o la inducció de la termogènesis ja que són dos efectes rellevants per aquesta tesi. En el cas de la pressió arterial, FGF21 actua en l'hipotàlem activant l'alliberació de corticosterona i reduint la hipertensió (Huang et al., 2017). Finalment, FGF21 augmenta l'activitat simpàtica i, això comporta una activació del *browning* (Coskun et al., 2008).

A continuació s'exposen els efectes tant centrals com sistèmics de FGF21 en les patologies estudiades en aquesta tesi.

Efectes de FGF21 en l'alcoholisme

Tal i com s'ha descrit en l'apartat de fetge, la ingesta aguda o crònica d'alcohol provoca un augment de l'expressió gènica de FGF21 en fetge i dels nivells circulants. Recentment, s'ha descrit que FGF21 també actua a nivell del sistema nerviós central (SNC) inhibint la preferència pel dolç i per l'alcohol tant en ratolins com en humans. FGF21 interacciona amb β -klotho en determinades àrees del cervell provocant una disminució dels nivells de dopamina i interferint en el sistema de recompensa hipotalàmic que inhibeix la preferència pel dolç i per l'alcohol. Els ratolins β -Klotho $-/-$ han perdut aquesta inhibició i tampoc la recuperen després del tractament amb FGF21 mostrant la necessitat de β -Klotho en aquest procés regulador (Schumann et al., 2016; Talukdar et al., 2016a). En humans, també s'han detectat variants en els gens de FGF21 i β -Klotho associades a canvis en el consum d'alcohol, que indicarien la implicació de FGF21 i β -Klotho en la regulació del consum d'alcohol en humans (Schumann et al., 2016; Sjøberg et al., 2017).

Durant la ingesta aguda d'alcohol els marcadors de dany hepàtic no estan alterats, per tant, es creu que l'augment circulat de FGF21 que es produeix actua a nivell del SNC per regular el consum d'alcohol. Per contra, durant la ingesta crònica d'alcohol els marcadors de dany hepàtic estan alterats degut a l'aparició del fetge gras de manera que en aquest cas l'augment en els nivells de FGF21 actuaria protegint del dany hepàtic i regulant el consum d'alcohol (Sjøberg et al., 2018).

Efectes de FGF21 en la hipertensió

Anteriorment, ja hem comentat el paper protector de FGF21 contra la dislipèmia en el fetge. Es creu que els efectes protectors de FGF21 contra la hipertensió són deguts a l'acció sobre tres teixits: hipotàlem, fetge i teixit adipós (Huang et al., 2017).

Recentment, s'ha descrit l'expressió de tots els FGFR i β -Klotho en les regions de l'hipotàlem encarregades de controlar la pressió arterial. La ingesta d'una dieta rica en fructosa reproduceix un model de hipertensió moderada i una disminució de l'expressió gènica de FGFR2 en l'hipotàlem i el fetge. L'administració de FGF21 en aquest model protegeix contra la hipertensió reactivant els seus efectes a nivell de l'hipotàlem. Aquest efecte protector s'observa a llarg termini però no a curt termini (He et al., 2016). A més a més, FGF21 també actua de forma directa sobre les neurones de l'hipotàlem activant l'alliberació de corticosterona que actua reduint la hipertensió. De forma indirecta FGF21 actua en els adipòcits promovent l'alliberació d'adiponectina que també té un efecte antihipertensiu (Figura 26).

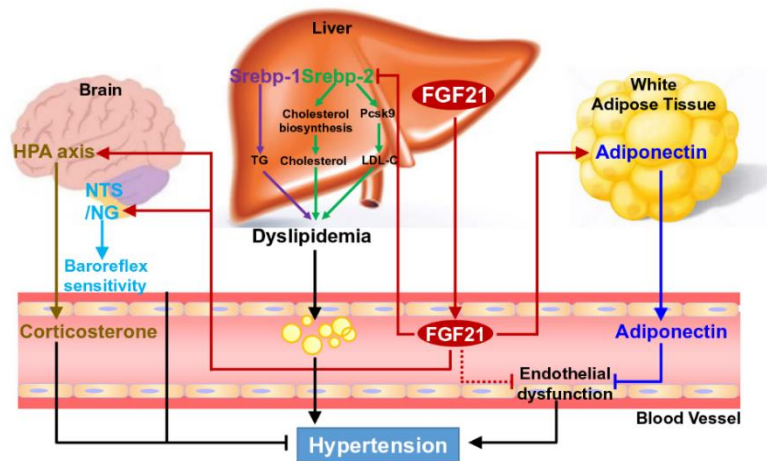


Figura 26. Combinació dels efectes protectors de FGF21 contra la hipertensió (Huang et al., 2017).

5.2.1.1.7 FGF21 en el cor

En els darrers anys, s'ha descrit que el cor no actua només bombejant la sang per tot el cos sinó que també actua com a òrgan endocrí secretant cardioquines a la circulació sanguínia. El cor expressa i secreta FGF21 en resposta a diferents estímuls patogènics com: l'aterosclerosi, la cardiomiopatia isquèmica, la hipertròfia cardíaca, la cardiomiopatia diabètica, la insuficiència cardíaca, etc. Aquest FGF21 secretat pel cor pot actuar de forma endocrina en altres òrgans o de forma paracrina o autocrina gràcies a l'expressió de FGFR1 i del cofactor β -Klotho en el cor (Cheng et al., 2016). Malgrat que FGF21 forma part de la subfamília dels FGFs endocrins, es creu que el FGF21 alliberat pel cor actua principalment de forma paracrina o autocrina ja que la seva aportació a la circulació sanguínia enfront els altres teixits com el fetge seria molt baixa. Tot i això, el cor segueix sent diana del FGF21 circulant que procedeix d'altres òrgans permetent la comunicació entre òrgans (Figura 27) (Planavila et al., 2015a).

En humans, s'han relacionat els nivells circulants de FGF21 elevats amb malalties cardiovasculars (Chou et al., 2016; Kim et al., 2015; Shen et al., 2013). A nivell d'expressió gènica, FGF21 també s'indueix en pacients amb insuficiència cardíaca (Planavila et al., 2015b).

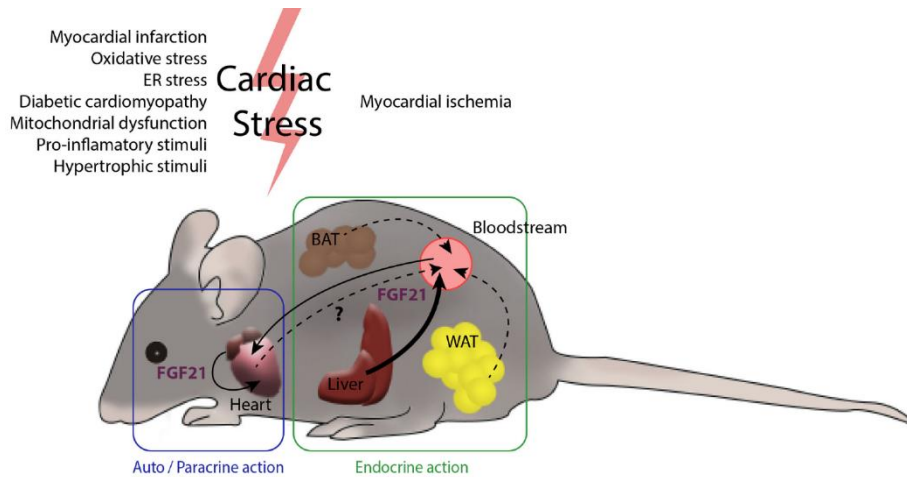


Figura 27. Sistema de comunicació de FGF21 entre òrgans perifèrics i cor. En l'organisme hi ha diversos òrgans que actuen com a productors i secretors de FGF21. El fetge és el principal òrgan productor i secretor de FGF21, tot i que els teixits adiposos també hi contribueixen en menor escala. Després d'un infart de miocardi, el fetge i els teixits adiposos alliberaran FGF21 a la circulació sanguínia. Aquest FGF21 endocrí juntament amb el FGF21 sintetitzat pel propi cor desencadenaran un efecte cardioprotector (Planavila et al., 2015a).

Seguidament s'exposa el paper de FGF21 en les principals patologies cardíques.

Hipertròfia cardíaca

El nostre grup va publicar el primer estudi on es va demostrar l'efecte cardioprotector de FGF21. Primerament, vam descriure l'expressió de FGFR1 i β -Klotho al cor, els qual són imprescindibles per l'acció de FGF21. Seguidament, vam demostrar que el tractament amb FGF21 és capaç d'activar la via de senyalització ERK en cardiomiòcits. I finalment, en estudis *in vivo* vam demostrar que els animals *Fgf21*^{-/-} presenten menys protecció contra la hipertròfia cardíaca induïda per isoproterenol (ISO), així com menys protecció contra la inflamació i l'estrès oxidatiu. Per altra banda, també vam demostrar com el tractament de ratolins nous amb FGF21 protegeix contra la hipertròfia cardíaca induïda per l'isoproterenol millorant la β -oxidació dels grassos, reduint la inflamació i l'estrès oxidatiu. FGF21 també redueix la inflamació mitjançant la inhibició del factor pro-inflamatori com $\text{NF}\kappa\beta$, i l'estrès oxidatiu augmentant l'expressió gènica d'enzims antioxidants com UCP2, UCP3 i SOD2 (Planavila et al., 2013, 2015b).

Aterosclerosis i malalties coronàries

FGF21 actua protegint contra l'aterosclerosis degut al seu paper regulador del metabolisme lipídic (Cheng et al., 2016). Ratolins *apoE*^{-/-}, model usat per a estudis d'aterosclerosis, presenten un increment dels nivells circulants de FGF21 (Lin et al., 2015). A més a més, el tractament amb FGF21 millora el metabolisme lipídic reduint l'aparició de plaques arterioscleròtiques en aquests ratolins (Wu et al., 2014). Finalment, estudis en rata han demostrat el mateix efecte protector de FGF21 enfront a l'aterosclerosis disminuint els nivells circulants de LDL i augmentant dels nivells circulants de HDL, juntament amb un efecte protector contra l'estrès oxidatiu (Zhu et al., 2014b).

En humans, els nivells circulants de FGF21 també estan augmentats en les malalties coronàries (Kim et al., 2015; Refsgaard Holm et al., 2019; Shen et al., 2013).

Cardiomiopatia isquèmica o infart de miocardi

La cardiomiopatia isquèmica i el dany per isquèmia-reperfusió es caracteritzen per promoure la mort cel·lular que acabarà generant una situació d'insuficiència cardíaca.

FGF21 també actua protegint contra la cardiomiopatia isquèmica reduint la mort cel·lular produïda per l'activació de la caspasa 3. En aquesta patologia, es creu que l'efecte protector de FGF21 es deu a un efecte endocrí. S'ha descrit que en situacions d'isquèmia cardíaca els nivells d'expressió de FGF21 en cor es mantenen constants, en canvi l'expressió i secreció a la circulació sanguínia augmenta en fetge i adiposos. Aquest FGF21 perifèric actua a nivell cardíac protegint contra l'apoptosis cel·lular i reduint l'àrea d'infart. El mateix estudi ha demostrat que els animals FGF21 -/- eren més susceptibles al dany isquèmic (Liu et al., 2013). Altres estudis han corroborat els resultats protectors del tractament amb FGF21 en models *in vivo* i *in vitro* d'isquèmia-reperfusió (Cong et al., 2013; Patel et al., 2014). Finalment, un estudi recent descriu com l'infart de miocardi agut augmenta el nivells circulants de norepinefrina i d'àcids grassos saturats lliures promovent la lipòlisis del teixit adipós. Aquests nivells elevats de norepinefrina i àcids grassos saturats actuaran en els cardiomiòcits induint la fosforilació d'AMPK i la transcripció de FGF21. A la vegada, aquest FGF21 sintetitzat pels cardiomiòcits pot actuar de forma autocrina tornant a induir la fosforilació d'AMPK i seguir augmentant els nivells de FGF21 que actuaran mantenint la homeòstasi mitocondrial i desenvolupant efectes cardioprotectors (Sunaga et al., 2019).

Per últim, també s'ha descrit que FGF21 protegeix contra el dany cardíac associat a la hipòxia modulant els nivells de galectin-3 (Sun et al., 2019).

Cardiomiopatia diabètica

La cardiomiopatia diabètica presenta nivells elevats de glucosa i lípids en sang que acaben provocant un augment de la inflamació en el teixit. Al principi, es caracteritza per un augment de l'apoptosi a nivell cardíac i al final acaba desenvolupant insuficiència cardíaca. S'ha descrit que FGF21 protegeix front a la cardiomiopatia diabètica a curt i a llarg termini. A curt termini, actua inhibint l'apoptosi de les cèl·lules cardíques activant la via de senyalització ERK-p38MAPK-AMPK. A llarg termini, actua prevenint la lipotoxicitat produïda pels elevats nivells d'àcids grassos circulants, disminuint l'estrès oxidatiu i la fibrosis. Zhang et al. va ser l'encarregat de descobrir el paper de FGF21 al llarg de la cardiomiopatia diabètica utilitzant ratolins com a model animal (Yang et al., 2018; Zhang et al., 2015a).

Alteracions mitocondrials

Es coneix que el múscul expressa i secreta FGF21 en resposta a patologies mitocondrials. Recentment, s'ha descrit que les alteracions mitocondrials també augmenten l'expressió de FGF21 a nivell cardíac. ATF4 regula la inducció en múscul i es desconeix si també ho fa en cor. Finalment, es creu que a nivell cardíac aquest FGF21 podria actuar de forma autocrina ja que l'aportació als nivells circulants seria molt inferior a la que exerceix el múscul (Dogan et al., 2014).

Finalment, la figura 28 resumeix els efectes protectors de FGF21 en les diferents patologies cardíaques.

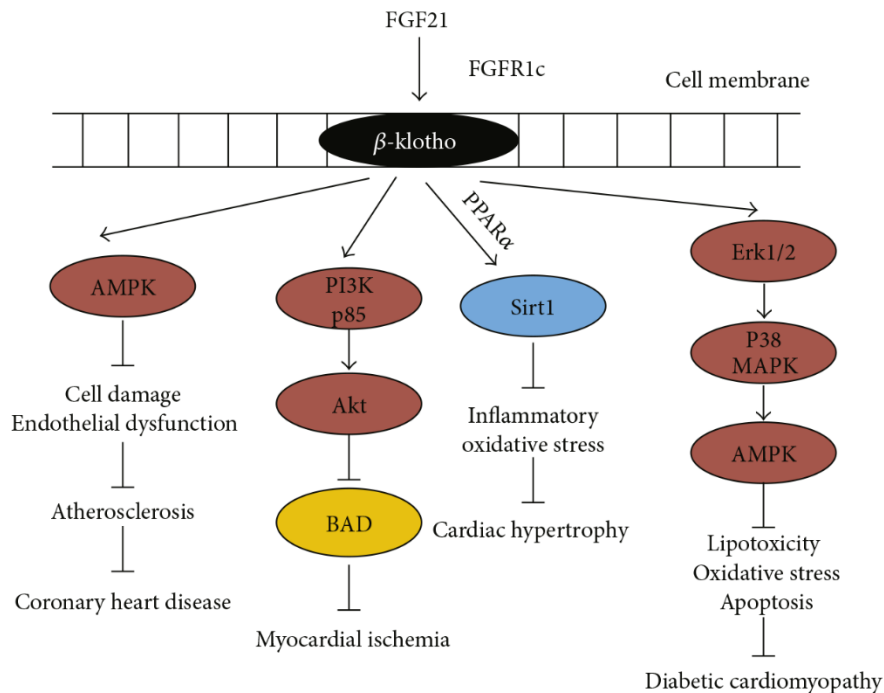


Figura 28. Efectes protectors de FGF21 en les patologies cardiovasculars (imatge adaptada de Cheng et al., 2016).

Hipertensió

Recentment, diversos estudis en models animals descriuen el paper protector de FGF21 envers el remodelat cardíac que provoca la hipertensió.

Al igual que en la cardiomiopatia isquèmica, s'ha descrit que FGF21 protegeix de forma endocrina contra la hipertensió. Pan et al. descriuen que la hipertensió induïda per l'Ang II augmenta l'expressió gènica de FGF21 en el fetge i els seus nivells circulants actuen de forma indirecta protegint el teixit aòrtic contra la hipertròfia, la fibrosi i l'estrès oxidatiu. L'augment de FGF21 va acompanyat de l'augment de l'expressió de ACE2 (*Angiotensin Converting Enzim 2*) als ronyons i al teixit adipós. ACE2 és l'efector final tal i com demostren els estudis amb ratolins ACE^{-/-} que perden la protecció de FGF21 al teixit aòrtic (Pan et al., 2018).

5.2.1.2 FGF21 en humans

El paper de FGF21 en ratolins ha estat molt ben estudiat. En els darrers anys, s'ha començat a estudiar el seu paper en humans. Els estudis realitzats han posat en evidència discrepàncies entre ratolins i humans. A nivell d'expressió gènica, FGF21 s'ha detectat en gran quantitat de teixits en ratolins mentre que, en humans només s'ha detectat en fetge, cervell i músculs esquelètic i cardíac (Figura 29). A nivell circulat, els humans presenten molta variabilitat entre individus sans pel què fa als nivells de FGF21, mentre que en ratolins els valors són més homogenis (Gälman et al., 2008; Staiger et al., 2017). Una altra de les discrepàncies observades fa referència a la regulació de l'estat nutricional. Estudis en ratolins mostren que 12 hores de dejuni són suficients per induir un pic d'expressió de FGF21 mentre que en humans es necessiten 7 dies per veure la

inducció (Gälman et al., 2008). Els nivells circulants de FGF21 es troben augmentats en les patologies associades al síndrome metabòlic que donaran lloc a diabetis tipus 2 i problemes cardiovasculars (Lee et al., 2012). Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, l'administració de FGF21 en models animals sotmesos a una HFD permet reduir la glucèmia, reduir els nivells de triacilglicèrids circulants i una pèrdua de pes corporal (Coskun et al., 2008). En canvi, l'administració de FGF21 (PF-05231023) en pacients amb diabetis tipus 2 produeix una pèrdua de pes corporal, la millora del perfil lipídic circulant però cap efecte sobre els nivells de glucosa circulant (Dong et al., 2015; Kim et al., 2017).

Per contra, els dos models (ratolins i humans) presenten similituds en altres aspectes. A nivell hepàtic, coincideixen en un augment dels nivells circulants de FGF21 degut a l'aparició de NAFLD i NASH (Dushay et al., 2010). A nivell cerebral, en ratolins s'ha descrit que FGF21 regula la ingesta de sucres i d'alcohol a través del SNC gràcies a l'expressió de β -Klotho al cervell (Talukdar et al., 2016a), i en humans també s'han trobat evidències de la implicació de FGF21 i β -Klotho en el sistema de recompensa del SNC (Søberg et al., 2017). Finalment, l'augment dels nivells circulants de FGF21 en models animals de diabetis tipus 2 i de malalties cardiovasculars també s'ha observat en humans (Kim et al., 2015; Lin et al., 2010; Shen et al., 2013).

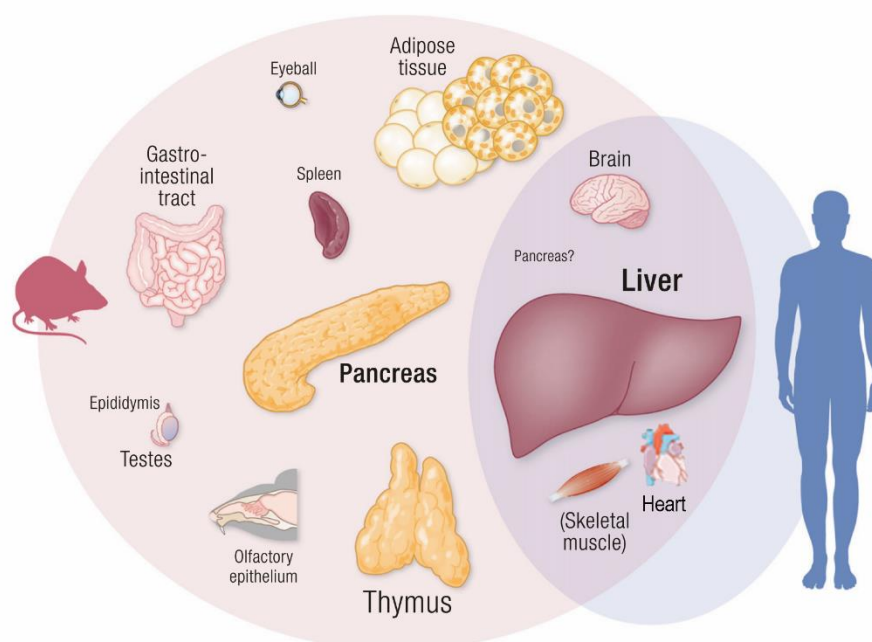


Figura 29. Principals teixits on s'expressa FGF21 en ratolins i en humans (Imatge adaptada de Staiger et al., 2017).

FGF21 com a tractament terapèutic

FGF21 és un potent regulador metabòlic que pot ser útil pel tractament de la diabetis tipus 2, l'obesitat o el NASH. FGF21 és una proteïna de 19.4 KDa, amb una vida mitja curta en circulació (<1 hora en ratolins; 0.5-2 hores en humans) i que s'elimina fàcilment a través de l'orina. A més, tendeix a formar agregats quan està en solució. Tot això, fa que necessiti modificacions a l'hora de ser utilitzada com a agent terapèutic. S'ha hagut d'augmentar la seva vida mitja i evitar la formació d'agregats per poder-la administrar mitjançant injeccions subcutànies (Sonoda et al., 2017).

Les empreses farmacèutiques han realitzat diverses modificacions al llarg dels anys. La primera modificació, LY2405319, va permetre augmentar la solubilitat i evitar la formació d'agregats en solució. LY2405319 conservava la mateixa potència i eficiència que la forma nativa. El fàrmac va ser testat en primats i en pacients amb obesitat i amb diabetis tipus 2 on va actuar millorant el perfil lipídic, disminuint el pes corporal i augmentant dels nivells circulants d'adiponectina (Adams et al., 2013; Gaich et al., 2013; Kharitononkov et al., 2013). Al veure que es reproduïa l'efecte terapèutic observat en ratolins, van realitzar una segona tanda de modificacions on es va augmentar la vida mitja de FGF21: PEG30-Q108, PF05231023 (o també CVX343), FcFGF21(RG) i AMG876. PEG30-Q108, consisteix en la fusió d'una cadena de polietilenglicol amb una molècula de FGF21. PF05231023 consisteix en la conjugació d'una molècula FGF21 amb una molècula IgG i finalment, FcFGF21(RG) i AMG876 presenten mutacions al domini d'inactivació de FGF21 per acció de la FAP (*Fibroblast activation protein*). Tots aquests fàrmacs presentaven una potència inferior a la de la forma nativa però al estar més temps en circulació s'obtenien millors resultats tal i com van demostrar els seus respectius estudis (Camacho et al., 2013; Huang et al., 2013; Véniant et al., 2012). Finalment, les darreres modificacions que s'han dut a terme consisteixen en anticossos específics que permeten activar el complex FGFR1- β -Klotho: C3201, BFKB8488A i NGM313. C3201 va ser testat en estudis amb primats obesos i es va observar una disminució del pes corporal (Smith et al., 2013). Per altre banda, BFKB8488A i NGM313 estan sent testats en estudis en humans i encara no s'han publicat els resultats.

Malgrat els efectes positius en el tractament de l'obesitat i la diabetis tipus 2 en ratolins, també s'ha detectat un efecte secundari. Els animals tractats amb FGF21 presenten símptomes de pèrdua òssia degut a efectes sobre els osteoblasts. En humans, l'estudi realitzat amb l'anàleg de FGF21, PF-05231023 també va mostrar alteracions en biomarcadors ossis (Staiger et al., 2017).

6. METEORIN-LIKE (METRNL)

Metrnl es va descobrir com a proteïna homòloga al factor neurotròfic Meteorin (Metrn). És una proteïna secretable que s'expressa en una gran varietat de teixits i es coneix també com a Metrnl, Cometina, Subfatina i Interleuquina 39 (IL-39).

Metrn i Metrnl són els dos únics membres de la seva família. Presenten una homologia en les seqüències d'aminoàcids del 40%. Mentre l'expressió de Metrn es centra en el cervell, Metrnl s'expressa en fetge, melsa, múscul, cor, cervell i teixit adipós.

En ratolí, el gen de Metrnl està situat al cromosoma 11qE2 en canvi, en humans es troba al cromosoma 17. Codifica per una proteïna de 311 aminoàcids amb un pèptid senyal de 45 aminoàcids a l'extrem N-terminal i sense domini transmembrana (Zheng et al., 2016). Les seqüències de Metrnl de ratolí i humà presenten un 77% d'homologia (Li et al., 2014). S'han trobat ortòlegs en tots els vertebrats però no en invertebrats (Zheng et al., 2016). En ratolí, pot presentar una glicosilació en l'aminoàcid de la posició 103 (Li et al., 2014).

6.1 EFECTES FISIOLÒGICS DE METRNL EN ELS TEIXITS

6.1.1 METRNL EN EL CERVELL

Metrn és un factor neurotròfic responsable de la migració, creixement i supervivència de les neurones així com del manteniment i la plasticitat de les neurones adultes. Degut a la similitud de Metrnl, es va pensar que podria desenvolupar la mateixa funció. L'expressió de Metrnl es troba restringida a la placa basal, en els ganglis de l'arrel dorsal i en l'oïda interna durant el desenvolupament mentre que, a diferència de Metrn, no es troba present en el sistema nerviós adult. Experiments *in vitro* han demostrat que el tractament amb Metrnl promou la formació de neurites a partir dels ganglis de l'arrel dorsal. Malgrat encara no es coneix cap dels receptors per Metrn i Metrnl, un estudi suggereix que actuen a través de diferents receptors ja que el tractament conjunt provoca efectes additius. A més a més, estudis *in vivo* han demostrat que el tractament amb Metrnl permet recuperar l'oïda en animals amb problemes de sordesa promovent la supervivència i funcionalitat de les neurones de l'oïda interna (Jørgensen et al., 2012).

6.1.2 METRNL EN EL SISTEMA IMMUNITARI

Metrnl té una elevada expressió en els teixits mucosos, la pell i els macròfags activats. En humans, la seva expressió es troba augmentada en algunes malalties de la pell com la psoriasis o l'artritis reumatoide posant de manifest que pot tenir un paper important en la resposta inflamatòria (Ushach et al., 2015).

Tal i com s'ha comentat, Metrnl es troba altament expressada en els macròfags activats. És important remarcar que els macròfags són cèl·lules del sistema immune i segons la seva activació es classifiquen en clàssics (M1) o alternatius (M2). Els macròfags M1 són activats per IFN γ o TNF α i tenen un paper pro-inflamatori amb funcions bactericides. Per contra, els macròfags M2 són

activats per IL-4 i tenen un paper anti-inflamatori i amb funcions en la resolució de la inflamació i la curació del teixit (Harwani, 2018).

L'expressió de *Metrnl* està associada als macròfags M2. Un estudi *in vitro* confirma que la producció de *Metrnl* en macròfags M2 està regulada per diverses citocines que la poden induir (TNF α , IL-17 α , IL-4) o inhibir (IFN γ i TGF β). A més a més, *Metrnl* també actua en els macròfags estimulants-ne la secreció de citocines anti-inflamatòries (IL-6, IL-10). Un altre estudi del mateix grup demostra com l'administració de lipopolisacàrid (LPS) en ratolins també augmenta l'expressió de *Metrnl* en els macròfags i els nivells circulants de la proteïna. Finalment, l'aparició de lesions inflamatòries espontànies amb el temps en els animals *Metrnl* $-/-$ confirma el seu paper com a molècula anti-inflamatòria (Ushach et al., 2018).

Tal i com es comentarà en el següent apartat, *Metrnl* també s'encarrega de l'activació dels macròfags M2 del teixit adipós blanc per tal d'induir la termogènesis (Rao et al., 2014).

6.1.3 METRNL EN EL TEIXIT ADIPÓS

Tant en humans com en ratolins, el teixit adipós blanc subcutani és el teixit amb major expressió de *Metrnl*. Tot i això, també s'expressa en altres dipòsits de teixit adipós com el perivascular o el teixit adipós marró (Li et al., 2014; Zheng et al., 2016). Al teixit adipós, tant els adipòcits com les cèl·lules de l'estroma vascular expressen *Metrnl*. La proteïna es troba distribuïda de forma homogènia en el citoplasma dels adipòcits i no es troba en les gotes lipídiques (Li et al., 2014).

Rao et al. van descriure com l'exposició aguda al fred augmenta els nivells circulants i l'expressió gènica de *Metrnl* en el teixit adipós. En canvi, aquests efectes es perden en una exposició crònica. Una de les principals conseqüències del fred és l'activació de la termogènesis. Aquests autors van demostrar que un augment dels nivells circulants de *Metrnl* activa el *browning* però no per un efecte directe sobre els adipòcits sinó per un efecte sobre els eosinòfils. Els eosinòfils augmenten l'expressió de IL-4 i IL-13 promovent l'activació dels macròfags del teixit adipós al fenotip M2, els quals alliberaran catecolamines desencadenant el *browning*. Durant aquest procés també s'activa l'expressió gènica d'enzims mitocondrials (Ucp1, Dio2, PGC1 α i ERR α) i anti-inflamatoris (IL-10, TGF β). El bloqueig de *Metrnl* *in vivo* impedeix l'activació dels macròfags M2 i la posterior activació dels gens termogènics. Per tant, un augment dels nivells circulants de *Metrnl* promou l'activació del *browning* i, aquest es tradueix en un augment de la despesa energètica i una millora en la homeòstasi de la glucosa que poden ser molt beneficioses per tractar malalties metabòliques (Rao et al., 2014).

Altres estudis han demostrat com *Metrnl* està fortament regulada pels canvis nutricionals de manera, que augmenta la seva expressió després d'una HFD i la disminueix durant la restricció calòrica (Li et al., 2014). Estudis amb ratolins que sobreexpressen *Metrnl* en els adipòcits mostren una millora en la resistència a la insulina produïda per una HFD. Aquesta millora és deguda a que *Metrnl* augmenta l'expressió gènica de factors implicats en la diferenciació dels adipòcits (PPAR γ , C/EBP α), metabolisme lipídic (FABP4 i CD36), lipogènesi, lipòlisi i emmagatzematge de lípids (perilipina). La formació d'adipòcits funcionals és clau per recuperar la homeòstasi metabòlica i

reduir la resistència a la insulina. El bloqueig de PPAR γ fa que es perdi l'efecte de sensibilització a la insulina de Metrnl. Finalment, els autors conclouen que l'efecte sensibilitzador a la insulina de Metrnl és un efecte autocrí o paracrí ja que al administrar Metrnl de forma intravenosa als animals deficients amb Metrnl en el teixit adipós sotmesos a HFD, no milloren la resistència a la insulina. A més, aquest efecte sensibilitzador a la insulina de Metrnl està mediat per PPAR γ (Li et al., 2015).

6.1.4 METRNL EN MÚSCUL

Metrnl s'ha descrit com una miocina expressada i secretada pel múscul esquelètic. La seva expressió i nivells circulants augmenten després de l'exercici tant en ratolins com en humans (Bae et al., 2018; Eaton et al., 2018; Jung et al., 2018; Rao et al., 2014).

Rao et al. van demostrar per primer cop com PGC1 α 4 (isoforma produïda durant el procés d'*splicing* de PGC1 α) augmentava l'expressió de Metrnl en múscul i els seus nivells circulants actuaven de forma endocrina activant el *browning* al teixit adipós (Rao et al., 2014).

Recentment, Jung et al. han demostrat com ratolins sotmesos a una HFD presenten una disminució dels nivells de Metrnl en el múscul esquelètic. El tractament d'aquests animals amb Metrnl redueix la inflamació, la resistència a la insulina i millora l'oxidació d'àcids grassos a través de les vies de senyalització d'AMPK i PPAR γ en el múscul. El tractament de Metrnl en cèl·lules musculars *in vitro* reproduïx els resultats anteriors gràcies a l'augment en l'expressió de gens relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos. Finalment, aquests autors també descriuen com Metrnl induïx l'expressió de PGC1 α a través de l'activació de la via AMPK (Jung et al., 2018).

6.1.5 METRNL EN HUMANS

En humans, s'ha descrit un augment de l'expressió de Metrnl en el teixit adipós de nens amb obesitat. En canvi, a diferència dels ratolins, Metrnl disminueix durant la diferenciació dels adipòcits humans *in vitro*. A més a més, la seva sobreexpressió inhibeix la diferenciació dels adipòcits humans disminuint l'expressió de PPAR γ . Tampoc s'ha observat cap relació entre Metrnl i la inducció de *browning in vitro* en aquest tipus cel·lular (Löffler et al., 2017).

Diversos estudis han descrit el paper de Metrnl en la homeòstasi de la glucosa i la resistència a la insulina en pacients amb diabetis tipus 2. Alguns estudis descriuen com els nivells circulants de Metrnl disminueixen en pacients amb diabetis tipus 2 (Dadmanesh et al., 2018; El-Ashmawy et al., 2019; Lee et al., 2018; Liu et al., 2019) mentre que d'altres descriuen que augmenten (Chung et al., 2018; Wang et al., 2019). També s'ha vist com els nivells de Metrnl correlacionen negativament amb els nivells de glucosa, resistència a la insulina, el perfil lipídic (Chung et al., 2018; Dadmanesh et al., 2018; El-Ashmawy et al., 2019; Lee et al., 2018; Liu et al., 2019) o amb la funció endotelial, perfil inflamatori i aterosclerosi (Dadmanesh et al., 2018; El-Ashmawy et al., 2019; Liu et al., 2019). Finalment, s'ha observat una correlació negativa entre els nivells circulants de Metrnl i l'índex de massa corporal (Dadmanesh et al., 2018; Liu et al., 2019) malgrat que Chung et al. no l'observa en el seu estudi (Chung et al., 2018). Es creu que la gran variabilitat entre

estudis pot ser deguda a diferències en l'edat dels pacients, diferències ètniques, en les malalties associades o en la medicació (Chung et al., 2018).

Recentment, s'ha començat a estudiar el paper de Metrnl en la malaltia coronària. Els estudis realitzats fins ara descriuen una disminució dels nivells circulants de Metrnl en pacients amb aquesta patologia i que, a més a més correlaciona negativament amb la severitat de la patologia (Dadmanesh et al., 2018; Liu et al., 2019).

7. ONCOSTATINA M (OSM)

L'OSM va ser aïllada l'any 1989 del medi de cultiu de la línia cel·lular U937 després de ser tractada amb forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) i té múltiples funcions en l'organisme (Malik et al., 1989) regulant l'expressió gènica, la supervivència, la proliferació i la diferenciació cel·lular.

És una citocina que forma part de la família de les citocines tipus IL-6. Presenta les mateixes característiques estructurals i funcionals que altres membres d'aquesta família però presenta la major similitud amb LIF (*leukemia inhibitor factor*), amb un 27% d'homologia en la seva seqüència d'aminoàcids (Gómez-Lechón, 1999).

En humans i ratolins, s'ha vist que la transcripció gènica d'OSM està regulada per c/EBP i elements rics en guanines i citocines (GC) a nivell basal, mentre que, STAT5 l'activa en situacions d'inflamació o dependents d'estímul (Berchtold et al., 1997; Ma et al., 1999; Yoshimura et al., 1996).

Està produïda per limfòcits T activats, monòcits, macròfags, neutròfils i cèl·lules dendrítiques en situacions d'inflamació. També s'expressa en la medul·la òssia i en menor grau a la melsa (Hermanns, 2015).

7.1 ESTRUCTURA

OSM és un monòmer secretable de 28 KDa, amb una cadena llarga que consta de quatre estructures en forma d'hèlix empaquetades en espiral. En humans, es sintetitza com a precursor amb 252 aminoàcids i es talla tant per l'extrem N-terminal com el C-terminal fins a obtenir la forma madura amb 196 aminoàcids (22 KDa). Es creu que el processament del precursor no és indispensable per a l'alliberació i acció de la citocina ja que proteïnes amb mutacions als seus llocs de tall han pogut ser alliberades al medi i actuar. Tot i això, el tall de l'extrem N-terminal afavoreix la inhibició del creixement en determinats tipus cel·lulars. A més, el fet que diferents formes d'OSM es puguin unir al receptor amb igual afinitat i, sense alteracions en la funció mostra que la unió al receptor no és el principal encarregat de desencadenar l'activitat de l'OSM (Gómez-Lechón, 1999; Linsley et al., 1990).

En humans, el gen que codifica per l'OSM està situat al cromosoma 22q12 a només 20 Kb del gen que codifica per LIF. La similitud i la proximitat entre els dos gens indica que són resultat d'un procés de duplicació gènica (Rose et al., 1993). L'OSM presenta ortòlegs en humans, ratolí i rata que s'han pogut purificar en els últims anys (Okaya et al., 2005; Yoshimura et al., 1996).

7.2 RECEPTORS

L'OSM i LIF presenten una gran similitud en la seqüència d'aminoàcids fent que, fins i tot puguin compartir receptor i un gran nombre de funcions biològiques. Malgrat això, hi havia una sèrie d'accions de l'OSM que no es podien atribuir al receptor de LIF, posant de manifest l'existència d'un altre receptor (Mosley et al., 1996). Actualment es coneix que l'OSM pot actuar a través de dos complexos de receptors (Figura 30):

- receptor tipus I format pel receptor LIFR i la proteïna transmembrana gp130
- receptor tipus II format pel receptor OSMR i la proteïna transmembrana gp130

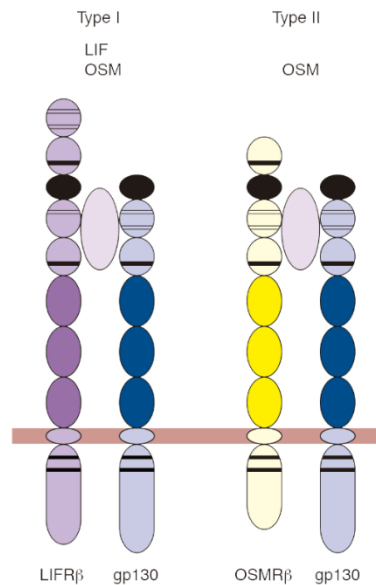


Figura 30. Estructura dels dos tipus de receptors de l'OSM (Imatge adaptada de Grant and Begley, 1999).

El OSMR s'expressa en el sistema vascular i en diversos teixits com el cor, pulmons, teixit adipós, pell, bufeta, teixit mamari, glàndules adrenal i pròstata. També es troba sobreexpressat en diferents tipus de càncers (Tanaka et al., 1999). La pròpia OSM també s'ha descrit que és capaç d'augmentar l'expressió dels seus receptors, OSMR, LIFR i gp130 (Blanchard et al., 2001).

Inicialment, es va descriure que només l'OSM humana i la de rata podien actuar a través dels dos tipus de receptors mentre que la de ratolí només actuava a través del receptor de tipus II. Recentment però, s'ha descobert que l'OSM de ratolí, com a mínim en osteoblasts, actua a través del complex de tipus I (Walker et al., 2010). Tot i això, es creu que el model de rata reflexa millor la situació de l'OSM en humans ja que s'uneix als dos tipus de receptors en tots els tipus cel·lulars (Drechsler et al., 2012).

La caracterització estructural de l'OSM humana ha permès identificar els seus llocs d'unió al complex del receptor. Al llarg de la seva estructura, l'OSM presenta dos regions conservades d'aminoàcids que s'anomenen lloc II i lloc III i que determinen la unió amb la proteïna gp130 i els receptors LIFR o OSMR, respectivament (Deller et al., 2000).

7.3 SENYALITZACIÓ CEL·LULAR

L'OSM és capaç d'activar diferents respostes cel·lulars que varien en funció del tipus cel·lular i del receptor activat.

Un cop l'OSM s'uneix al complex del receptor, la proteïna gp 130 s'encarregarà d'activar les vies de senyalització. La part intracel·lular de la proteïna gp130 consta de dos llocs d'unió per reclutar les proteïnes encarregades d'amplificar el senyal. La cascada de senyalització comença amb

l'activació dels membres de la família de JAK (*Janus kinase*)(JAK1, JAK2 o TYK2) fosforilant un residu de la cua citoplasmàtica de la proteïna gp 130 que permetrà reclutar diferents proteïnes i amplificar el senyal. A més, els membres de la família JAK també activen altres factors com els components de la via STAT. Un cop fosforil·lats els factors de transcripció STAT1 i STAT3 entren al nucli on regulen la transcripció de determinats gens (Gómez-Lechón, 1999). La via de senyalització de STAT activa sobretot, la transcripció de gens implicats amb inflamació (Richards, 2013). Per altre banda, els membres de la família JAK també poden fosforil·lar molècules que contenen el domini Shc fent que s'uneixin a la proteïna gp130. Seguidament, aquestes molècules amb dominis Shc reclutaran el complex Grb2-SOS que acabarà amb l'activació de la via MAPK i la transcripció d'altres gens diana (Figura 31) (Gómez-Lechón, 1999).

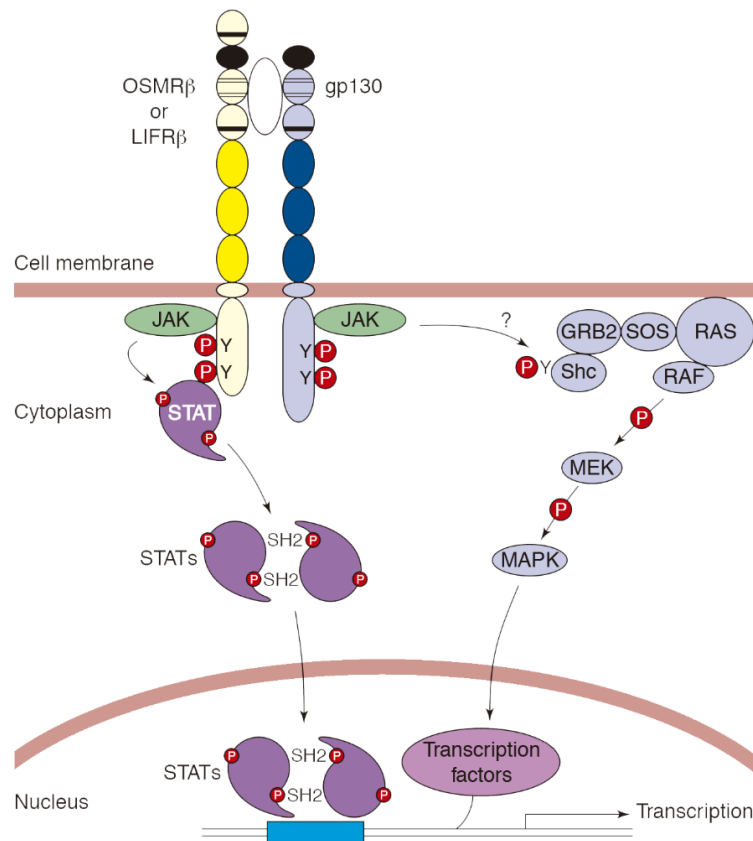


Figura 31. Representació de les principals vies de senyalització activades per l'OSM. (Imatge adaptada de Grant and Begley, 1999).

7.4 EFECTES FISIOLÒGICS DE L'OSM EN ELS TEIXITS

7.4.1 OSM EN EL TEIXIT ADIPÓS

L'OSM està implicada en l'obesitat i les malalties metabòliques malgrat que el seu paper és controvertit. D'una banda s'han descrit efectes adversos de l'OSM, com un efecte pro-inflamatori al TAB i la inducció a la resistència a la insulina durant l'obesitat. Sánchez-Infantes et al. han descrit que durant l'obesitat els macròfags del TAB secreten OSM i, aquesta actua de forma paracrina en els adipòcits augmentant la secreció de citocines pro-inflamatòries (Figura 32) (Sanchez-Infantes et al., 2014). A més, un estudi recent també ha demostrat que la neutralització dels nivells sistèmics d'OSM en animals sotmesos a una HFD redueix l'alliberació de citocines pro-

inflamatòries en el TAB i els nivells circulants de glucosa (Piquer-Garcia et al., 2019). Per altra banda, altres autors han descrit un efecte protector de l'OSM mostrant que la manca del receptor de l'OSM augmenta l'adipositat i empitjora la inflamació del teixit adipós blanc, la esteatosis hepàtica i la resistència a la insulina causada per la HFD (Elks et al., 2016; Komori et al., 2013, 2014). A més, el tractament amb OSM els ha permès revertir els efectes mencionats anteriorment disminuint l'adipositat (Komori et al., 2013, 2014), protegint contra la resistència a la insulina (Komori et al., 2014, 2015) i millorant la tolerància a la glucosa i (Komori et al., 2013). Els primers autors suggereixen que la disminució de l'adipositat observada amb el tractament d'OSM pot ser deguda a un efecte tòxic per les elevades dosis d'OSM utilitzades i, que la utilització d'animals deficientes en el receptor de l'OSM en tots els teixits dificulta la determinació de causa o efecte i d'avaluar si el seu fenotip està relacionat amb alteracions durant el desenvolupament (Elks et al., 2015). Els efectes contradictoris de l'OSM durant l'obesitat posen de manifest la necessitat de seguir investigant en aquest àmbit.

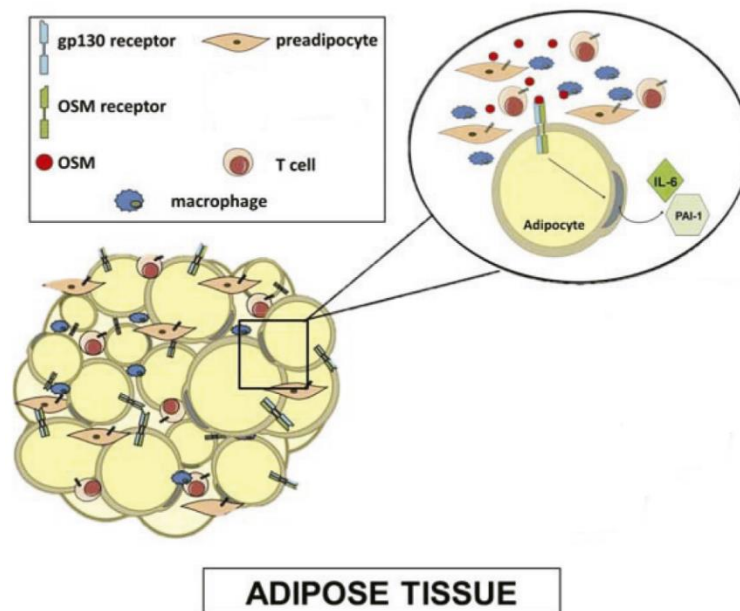


Figura 32. Efectes de l'OSM en el teixit adipós blanc durant l'obesitat (Imatge adaptada de Elks et al., 2015).

A més, també s'ha descrit el paper de l'OSM en el teixit adipós marró durant l'obesitat. L'expressió d'OSM augmenta en aquest teixit en animals sotmesos a una HFD. A més, l'administració exògena d'OSM augmenta la inflamació i disminueix l'emmagatzematge de lípids en el TAM. El tractament amb OSM també impedeix la diferenciació de preadipòcits marrons a adipòcits marrons *in vitro*, i inhibeix el procés de *browning* del TAB després de sotmetre els animals a condicions de fred. Per tant, l'OSM inhibeix l'activitat del TAM i impedeix el procés del *browning* (Sánchez-Infantes et al., 2017).

En humans, fa uns anys es va descriure que l'expressió proteica de l'OSM està augmentada en el teixit adipós subcutani de pacients amb obesitat i diabetis tipus 2. A més, aquests nivells d'OSM correlacionen positivament amb el pes corporal i els nivells d'insulina en aquests pacients (Sanchez-Infantes et al., 2014). Un altre estudi confirma que els nivells circulants d'OSM augmenten en pacients amb resistència a la insulina i que aquests nivells correlacionen amb

marcadors d'inflamació com la proteïna reactiva C (CRP) (Akarsu et al., 2019). Recentment, s'ha descrit que els nivells d'expressió gènica de l'OSM augmenten en el teixit adipós subcutani i visceral de pacients amb obesitat i hiperglucèmia. Aquests nivells d'OSM en teixit s'han correlacionat amb els nivells d'expressió de Glut4 i marcadors d'inflamació, els nivells circulants d'insulina i la resistència a la insulina (HOMA-IR). Finalment, confirmen l'efecte negatiu de l'OSM en els adipòcits humans ja que inhibeix l'adipogènesis i indueix inflamació (Piquer-Garcia et al., 2019).

7.4.2 OSM AL FETGE

L'OSM té un paper rellevant en el metabolisme lipídic hepàtic ja que augmenta l'expressió del receptor de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) (Grove et al., 1991). A més, l'OSM també té importància en la resistència a la insulina malgrat el seu paper és controvertit. Al igual que en el teixit adipós, uns autors descriuen un efecte perjudicial (Henkel et al., 2011) mentre que uns altres descriuen un efecte protector (Luo et al., 2016)

OBJECTIUS

8. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi va ser avançar en el coneixement del paper de la proteïna FGF21 en relació a la patologia cardíaca, i de les proteïnes Metrnl i OSM en relació a l'obesitat com a factor de risc cardiovascular. Aquest objectiu general es va dividir en tres apartats:

- 1) Estudiar el paper de FGF21 durant el desenvolupament de la fibrosis cardíaca en el model de cardiomiopatia hipertensa.
- 2) Caracteritzar el paper de FGF21 a nivell cardíac en el model d'ingesta crònica d'alcohol.
- 3) Estudiar el paper de Metrnl i l'OSM en l'obesitat durant el post operatori, en pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica.

**INFORME DELS CODIRECTORS
DE TESI**

9. INFORME DELS CODIRECTORS DE TESI

Informe dels codirectors en relació a la tesi doctoral de Gemma Ferrer Curriu (publicacions i paper de la doctoranda)

En tant que codirectors de la Tesi Doctoral de Gemma Ferrer Curriu, fem constar que els treballs corresponents a la memòria científica s'estructuren en base als següents articles científics.

- **Ferrer-Curriu G**, Redondo-Angulo I, Guitart-Mampel M, Rupérez C, Mas-Stachurska A, Sitges M, Garrabou G, Villarroya F, Fernández-Solà J, Planavila A

Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease

J Pathol. 2019 May;248(1):30-40

IF: 5.9 (2018) 8/76 (Pathology) Primer decil (D1)

La doctoranda, primera autora de la publicació, ha participat en l'obtenció experimental de les dades tant dels models *in vivo* com *in vitro* així com en l'evolució i progressió dels estudis. El paper dels altres coautors ha estat l'ajuda en l'obtenció del model animal o el processament de les mostres humanes fruit d'una col·laboració dins del projecte d'investigació.

- **Ferrer-Curriu G**, Guitart-Mampel M, Crispí F, Villarroya F, Garrabou G, Fernández-Solà J, Planavila A

The protective effect of Fibroblast growth factor-21 in Alcoholic Cardiomyopathy: is there a role on mitochondrial dysfunction?

Enviat a: Journal of Pathology

IF: 5.9 (2018) 8/76 (Pathology) Primer decil (D1)

La doctoranda, coautora de la publicació, ha participat en l'obtenció experimental de les dades del model animal així com en l'evolució i progressió dels estudis. El paper dels altres coautors ha estat l'obtenció i processament de les mostres humanes.

- Pellitero S, Piquer-Garcia I, **Ferrer-Curriu G**, Puig R, Martínez E, Moreno P, Tarascó J, Balibrea J, Lerin C, Puig-Domingo M, Villarroya F, Planavila A, Sánchez-Infantes D

Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery

Int J Obes (Lond). 2018 Apr;42(4):919-922

IF: 4.5 29/145 Endocrinology & Metabolism Primer quartil (Q1)

La doctoranda, com a coautora de la publicació, ha participat de forma activa en la determinació experimental dels nivells de Metrnl en les mostres humanes.

A Barcelona, elde.....de 2020

Signat:

Dra. Anna Planavila Porta

Directora

Dr. Francesc Villarroya Gombau

Director

PUBLICACIONES

Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease

Revista: Journal of Pathology

PMID: 30582148

Títol: Fibroblast growth factor 21 protegeix contra la fibrosis en la cardiomiopatia hipertensa.

Resum:

FGF21 és un factor endocrí que contribueix a múltiples processos fisiopatològics, principalment per les seves accions com a regulador metabòlic i agent cardioprotector. Estudis recents han demostrat un augment en els nivells circulants de FGF21 en pacients amb hipertensió i en models d'hipertensió en ratolins. Tot i això, la rellevància de FGF21 en la cardiomiopatia hipertensa no ha estat abordada. En aquest estudi, es va induir hipertensió en ratolins WT i Fgf21 $-/-$ de 4 mesos d'edat tractant-los amb Angiotensina II (Ang II) durant una setmana, obtenint un increment similar de la pressió sanguínia en ambdós genotips. Els nivells circulants i l'expressió gènica de FGF21 en cor i fetge van augmentar de forma significativa en els animals WT hipertensos en comparació amb els controls juntament amb un augment de l'expressió gènica de β -Klotho (KLB) en el cor. Els ratolins Fgf21 $-/-$ van desenvolupar cardiomiopatia hipertensa més severa que els WT, caracteritzada per una marcada disfunció cardíaca i fibrosis. A més a més, també vam demostrar que FGF21 té un important efecte protector front a la fibrosis cardíaca tant *in vitro* com *in vivo*. Finalment, en biòpsies de ventricle esquerre de donants amb cardiomiopatia hipertensa vam detectar un augment significatiu de FGF21 en comparació amb els controls, resultat que es va associar a una millora significativa de la fibrosis i la hipertròfia. Com a conclusió, durant la hipertensió els nivells sistèmics i cardíacs de FGF21 són induïts i actuen en el cor protegint de la cardiomiopatia hipertensa. Per tant, FGF21 actuaria com un factor principal en la fibrogènesi associada a la cardiomiopatia hipertensa.

Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease

Gemma Ferrer-Curriu^{1,2}, Ibon Redondo-Angulo^{1,2}, Mariona Guitart-Mampel³, Celia Ruperez^{1,2}, Aleksandra Mas-Stachurska⁴, Marta Sitges⁴, Gloria Garrabou³, Francesc Villarroya^{1,2}, Joaquim Fernández-Solà⁵ and Anna Planavila^{1,2*} 

¹ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Barcelona, Spain

³ Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine and Health Science, University of Barcelona, Internal Medicine Service, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona and CIBERER, Barcelona, Spain

⁴ Cardiology Department, Thorax Institute, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵ Department of Medicine, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Correspondence to: A Planavila, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: aplanavila@ub.edu

Abstract

FGF21 is an endocrine factor that contributes to multiple pathophysiological processes, mainly via its action as a metabolic regulator and cardioprotective agent. Recent studies have shown increased circulating FGF21 levels in hypertensive patients and in mouse models of hypertension. However, the relevance of FGF21 in hypertensive heart disease has not been addressed. Hypertension was induced by treating 4-month old WT and *Fgf21*^{-/-} mice with angiotensin II (AngII) for 1 week, resulting in a similar increase in blood pressure in both genotypes. Plasma FGF21 levels and expression in heart and liver were significantly increased in hypertensive WT mice relative to controls, an effect that was associated with increased expression levels of β -klotho specifically in the heart. *Fgf21*^{-/-} mice developed a greater degree of hypertensive heart disease than WT mice, notably characterized by extensive cardiac dysfunction and fibrosis. *In vitro* and *in vivo* studies further showed that FGF21 exerted a marked protective effect against cardiac fibrosis. Finally, left ventricle biopsies from human hypertensive heart donors, especially those developing cardiomyopathy, showed a significant increase in FGF21 expression compared with normotensive controls, a finding that was associated with significantly enhanced cardiac hypertrophy and fibrosis. We conclude that during hypertension, both systemic and cardiac-produced FGF21 are induced and act on the heart, protecting it from hypertensive heart disease. Thus, FGF21 acts as key factor in the fibrogenesis associated with hypertensive heart disease.

Copyright © 2018 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: hypertension; fibrosis; FGF21; human cardiomyopathy

Received 23 July 2018; Revised 16 November 2018; Accepted 19 December 2018

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Arterial hypertension, which afflicts more than 40% of adults in developed countries [1], is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. Importantly, arterial hypertension is the most important risk factor for heart failure [2,3]. The heart is one of the major organs affected in subjects with long-term hypertension. Up to 20% of subjects with defined hypertension and 80% of those with severe hypertension develop functional or structural heart changes, leading to diastolic dysfunction, progressive left-ventricular (LV) hypertrophy, interstitial fibrosis, systolic dysfunction and chronic heart failure, a disease commonly termed hypertensive heart disease [4,5]. In fact, cardiac fibrosis,

which leads to increased myocardial stiffness, appears to be more relevant in hypertensive heart failure than in heart failure produced by other causes. Importantly, one of the major features of hypertensive heart disease is the early transition of cardiac fibroblasts (CFs) to myofibroblasts prior to cardiac hypertrophy development. Upon activation by angiotensin II (AngII), among other factors, fibroblasts in the heart start proliferating and ultimately differentiate towards myofibroblasts [6]. Although fibroblasts are responsible for normal collagen turnover, myofibroblasts account for the disproportionate accumulation of ECM components that lead to impaired cardiac function and cellular dysfunction [7].

Recent clinical studies have shown that increased circulating levels of FGF21, a hormonal factor that acts as

a metabolic regulator, are significantly associated with elevated blood pressure in patients with hypertension [8,9]. Moreover, studies in mice have demonstrated that treatment with FGF21 prevents hypertension and vascular dysfunction [10]. FGF21 is mainly produced and released into the blood by the liver [11,12], but extrahepatic tissues, such as white and brown adipose tissues (BATs) also express FGF21 [13–15]. The action of FGF21 on target cells requires FGF receptors (FGFRs) and β -klotho, a single-pass transmembrane protein that functions as an obligate cofactor for FGF21 signaling [16,17]. Recent studies have demonstrated that FGF21 plays an important role in cardiac remodeling [18–21]. Notably, the heart is both a target and a source of FGF21: cardiac tissues express FGFR1, β -klotho, and FGF21 [19], the latter of which protects the heart against pathologic cardiac hypertrophy and myocardial infarction in mouse models [19,21]. However, the cardiac consequences of elevated FGF21 during hypertensive heart disease have not yet been explored.

Here, we sought to determine the role of FGF21 during hypertensive heart disease. We show that hypertension increases systemic FGF21 levels, cardiac and liver FGF21 expression, and β -klotho expression in the mouse heart. Moreover, we demonstrated that FGF21 insufficiency (in *Fgf21*^{-/-} mice) exacerbates hypertensive heart disease, most notably through modulation of cardiac fibrosis. Finally, an analysis of human cardiac samples from hypertensive donors confirmed cardiac FGF21 upregulation compared with normotensive controls, especially those developing cardiomyopathy, a fact related to the significantly enhanced cardiac hypertrophy and fibrosis observed in these patients. These results indicate that FGF21 is a major mediator in the development of hypertensive heart disease.

Materials and methods

Animals

All experiments were performed according to the guidelines of Directive 2010/63/EU of the European Parliament, and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona (DAAM 6648).

Fgf21^{-/-} mice (B6N;129S5-*Fgf21*^{tm1Lex/Mmcd}) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), an NCR/NIH-funded strain repository, and were donated to the MMRRC by Genentech, Inc. Four-month old WT and *Fgf21*^{-/-} mice were anesthetized with 1.5% isoflurane and subcutaneous ALZET osmotic mini-pumps containing PBS or AngII (Sigma, St. Louis, MO, USA), the latter calibrated to release AngII at a rate of 1 mg/kg/day for 7 days, were surgically implanted subcutaneously in the interscapular region of the mouse.

Cardiac fibrosis was induced in neonatal mice by i.p. injecting WT and *Fgf21*-null 6-day-old neonates mice with isoproterenol (ISO) (15 mg/kg/day; Sigma)

alone or together with FGF21 (2.5 μ g/g/day; Phoenix Pharmaceuticals Inc.), for 7 days.

Cell culture

Rat neonatal CFs were isolated from the ventricles of 1–2 day old Sprague–Dawley rats as described by Teunissen *et al* [22]. P1 and P3 cells were plated at a density of 0.3×10^5 cells/cm² on culture dishes and grown for 24 h. Thereafter, cells were serum starved for 24 h followed by incubation with FGF21 (50 nM; Phoenix Pharmaceuticals Inc.) for another 24 h.

Blood pressure and heart rate

Mouse blood pressure was measured using the tail-cuff method (BP2000; Visitech Systems, Apex, NC, USA). Mice were trained according to the manufacturer's instructions for 5 days before mini-pump implantation. Ten consecutive measurements were averaged to calculate systolic, diastolic and mean arterial blood pressure and heart rate during the 7-day period of mini-pump duration.

Echocardiography measurement

Mice were anesthetized with 1.5% isoflurane, and cardiac dimensions were assessed by echocardiography using a commercially available system (Vivid Q; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equipped with a 12-MHz linear probe. Ventricular dimensions were measured using M-mode scans across the left ventricle.

Analysis of plasma metabolites and hormone levels

Glucose and triglyceride levels were measured using an Accutrend Technology System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma FGF21 levels were measured using a mouse/human FGF21 ELISA kit (Biovendor).

Heart histology

Each heart was extracted and cut transversely at mid-height. One half was fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned. The sections were deparaffinized and stained with H&E for determination of cardiomyocyte size using the ImageJ software. Fibrosis was determined by Masson's Trichrome staining (Panreac, Barcelona, Spain).

Gene expression analyses

Total RNA was isolated from LV tissues using TriPure (Roche, Indianapolis, IN, USA). RNA was extracted from the liver, BAT, and WAT using NucleoSpin RNA columns (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany). RT was performed using 0.5 μ g total RNA and random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a reaction volume of 20 μ l. Expression of target genes was assessed by quantitative PCR (qPCR) using TaqMan gene expression assays

Fgf21 protects against cardiac fibrosis

(Applied Biosystems). Cyclophilin A (*PpiA*) was used as an endogenous reference gene.

Western blotting

Western blot analyses were performed using antibodies against α -smooth muscle actin (α -SMA; Sigma) and GAPDH (Sigma). Whole-cell lysates were obtained as previously described [23], and proteins were separated by SDS-PAGE on 12% gels and transferred to Immobilon-P membranes (Merck).

Human samples

Hearts from donors under 70 years of age with brain death of cerebrovascular or traumatic origin were routinely evaluated for possible transplantation at the transplant unit of the Hospital Clinic. From these samples, nine control hearts were collected from healthy normotensive individuals (controls) and 28 hearts were obtained from donors with longstanding hypertension (cases) who were not eligible for transplantation because of a lack of a matched recipient or inadequate size. Of these 28 hearts, 18 exhibited clinical and echosonographical criteria for dilated cardiomyopathy defined as the presence of a LV ejection fraction (LVEF) below 50% and LV enlargement. Hypertension was defined as values of systolic blood pressure of at least 140 mmHg and/or diastolic blood pressure of at least 90 mmHg. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain) Ref. HCB/2015/0233, and informed consent regarding the use of myocardium tissue for this research was obtained from the families of donors prior to the study. The authors of this manuscript certify compliance with the statement on ethics outlined in the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 1983.

Human histological studies

Myocardial cell hypertrophy, as well as fibrosis, were evaluated by histological morphometry of each sample, as previously reported [24]. Myocardial expression of FGF21 was measured by immunostaining with an anti-FGF21 antibody (Abcam137715, 1/500, Abcam, Cambridge, UK). Six areas of each sample were evaluated, and a total of 200–600 cells were assessed per field (≥ 1200 cells/sample). FGF21 expression index was calculated as the ratio of positively stained myocytes to non-stained myocytes. Immunohistochemical evaluations were performed by two independent persons.

Statistical analysis

The results are presented as means \pm SEM. Data were analyzed using an unpaired *t*-test or one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test (for quantitative variables) or Fisher test (for dichotomous variables and contingency tables), as appropriate. Analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characterization of the FGF21 system during hypertension

To determine the role of FGF21 during hypertension, we treated mice for 7 days with AngII to induce hypertension and associated hypertensive heart disease [25]. First, we analyzed circulating levels of FGF21 in AngII-infused WT mice and corresponding PBS-infused controls (CT). We found that plasma levels of FGF21 were significantly increased after 1 week of AngII infusion (Figure 1A). A subsequent analysis of *Fgf21* mRNA expression levels in the liver, epididymal white adipose tissue (eWAT), inguinal WAT (iWAT), BAT, and heart revealed a significant induction in the liver and in the heart of AngII-treated mice compared with CT mice, but showed no change in BAT or WAT (Figure 1B). To further characterize FGF21 signaling during hypertension, we next analyzed expression levels of mRNA encoding the FGF21 receptors, FGFR1 and FGFR4, and its co-receptor, β -klotho (KLB) (Figure 1C). We found no significant changes in *Fgfr1* or *Fgfr4* mRNA levels in any of the tissues analyzed. Interestingly, whereas expression of *Klb* mRNA in the liver, WAT, and BAT were either unaltered (in liver, BAT, iWAT) or significantly reduced (in eWAT) in hypertension, cardiac *Klb* mRNA levels were significantly increased. The expression levels of the FGF receptors *Fgfr2* and *Fgfr3* [17] were unchanged (see supplementary material, Figure S1A). Finally, the gene expression of FGF21, KLB and FGF receptors in pancreas, a tissue with a high expression of FGF21 [26], was not altered in response to hypertension (see supplementary material, Figure S1B). These results collectively indicate that plasma protein levels and cardiac and hepatic expression levels of FGF21 are increased during hypertension in mice. Moreover, hypertension appears to specifically induce β -klotho in the heart.

FGF21 deficiency does not exacerbate hypertension induced by 7-day AngII-treatment

Next, to clarify the role of increased FGF21 levels during the pathogenesis of AngII-induced hypertensive heart disease, we evaluated the effects of FGF21 deficiency in mice. In studying the cardiac effects of FGF21 during the development of hypertensive heart disease, it is necessary to avoid the effects of secondary factors reported to be altered in *Fgf21*^{-/-} mice after 14 days of AngII treatment, such as remodeling, inflammation and fibrosis of the vasculature, and overt induction of blood pressure [10]. To this end, we chose a shorter, 7-day AngII treatment (Figure 2). We found no significant differences in basal blood pressure or heart rate between control (untreated) WT and *Fgf21*^{-/-} mice. As expected, diastolic, systolic and mean arterial pressure (MAP) were significantly increased after 7 days of AngII infusion in WT mice compared with the corresponding untreated CT mice. However, we found no significant differences

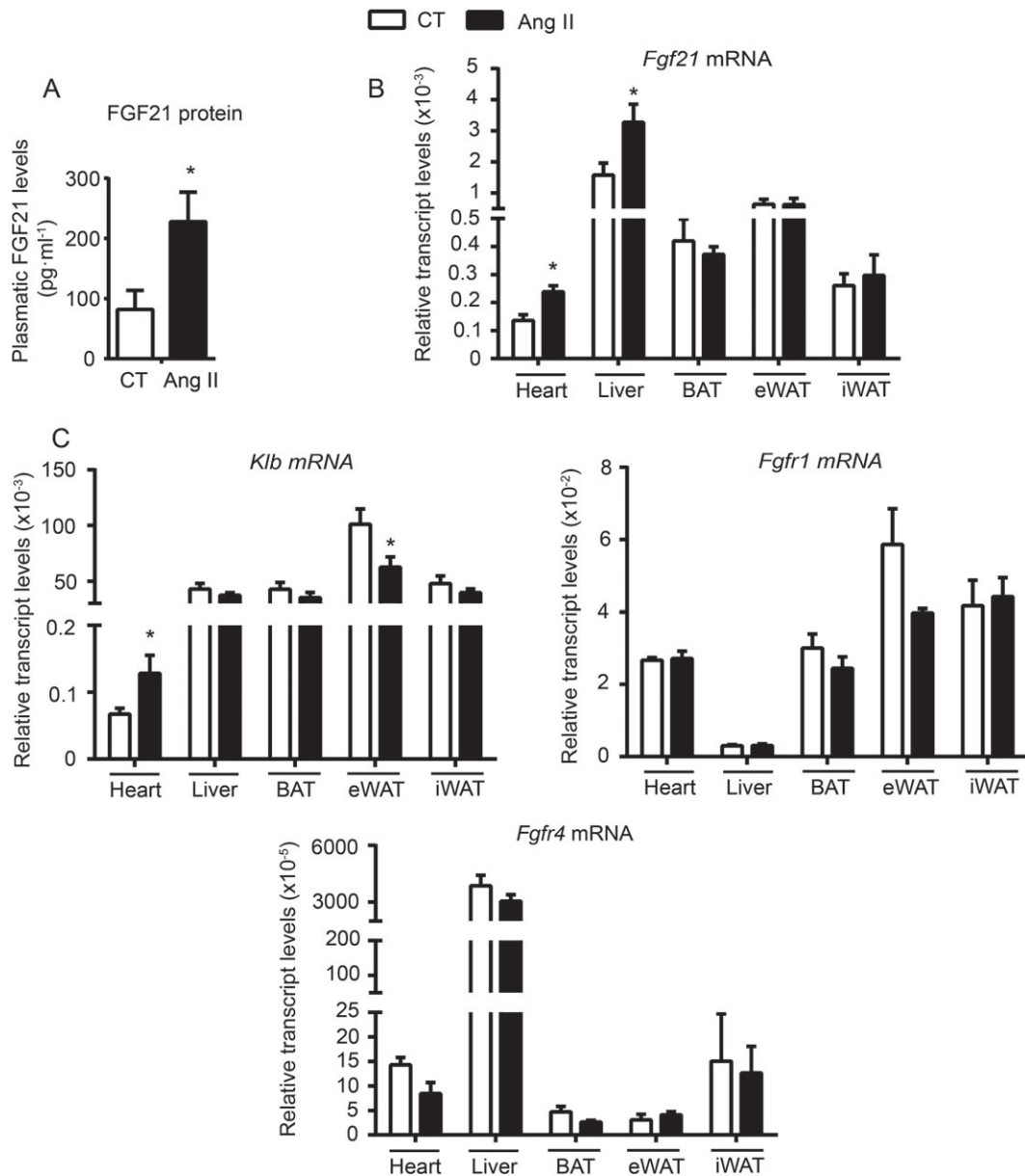


Figure 1. Characterization of the FGF21 system during hypertension. Hypertensive heart disease was experimentally induced by continuously infusing adult WT mice with AngII for 7 days. (A) Plasma levels of FGF21 in PBS-treated mice (CT) and AngII-treated mice (AngII). (B) mRNA expression levels of *Fgf21* in heart, liver, BAT, epididymal and inguinal white adipose tissues (eWAT and iWAT) in control and AngII WT mice. (C) mRNA expression levels of the co-receptor β -klotho (*Klb*) and the FGF21 receptors *Fgfr1* and *Fgfr4* in heart, liver, BAT, eWAT and iWAT in control and AngII WT mice. Results are presented as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group; * $p < 0.05$ compared with the corresponding CT mice).

in diastolic, systolic or MAP pressures between WT and *Fgf21*^{-/-} mice after 7 days of AngII infusion, indicating that the alterations observed in *Fgf21*^{-/-} mice after a 14-day AngII-infusion [10] have not yet occurred with this short-term treatment; thus, any cardiac effects of the lack of FGF21, if any, would be unrelated to elevated blood pressure.

Since FGF21 is an important metabolic regulator involved in the control of glucose metabolism [27], we next evaluated the impact of AngII treatment on body weight, blood glucose and triglycerides in WT and *Fgf21*^{-/-} mice (see supplementary material, Table S1). We found no significant differences in body weight associated with AngII treatment or genotype. Moreover,

we observed no significant differences in either blood triglycerides or glucose in any experimental group.

Collectively, these results indicate that, after 7 days of AngII infusion, FGF21 deficiency does not trigger any major alterations in terms of body weight, metabolic profile, heart rate, or blood pressure.

Lack of FGF21 impairs cardiac remodeling in hypertensive heart disease

We next analyzed the impact of FGF21 deficiency on cardiac morphology after 1 week AngII infusion in WT and *Fgf21*^{-/-} mice. As shown in Figure 3A, the heart weight/tibia length (HW/TL) ratio, a measure of cardiac enlargement, was significantly increased after

Fgf21 protects against cardiac fibrosis

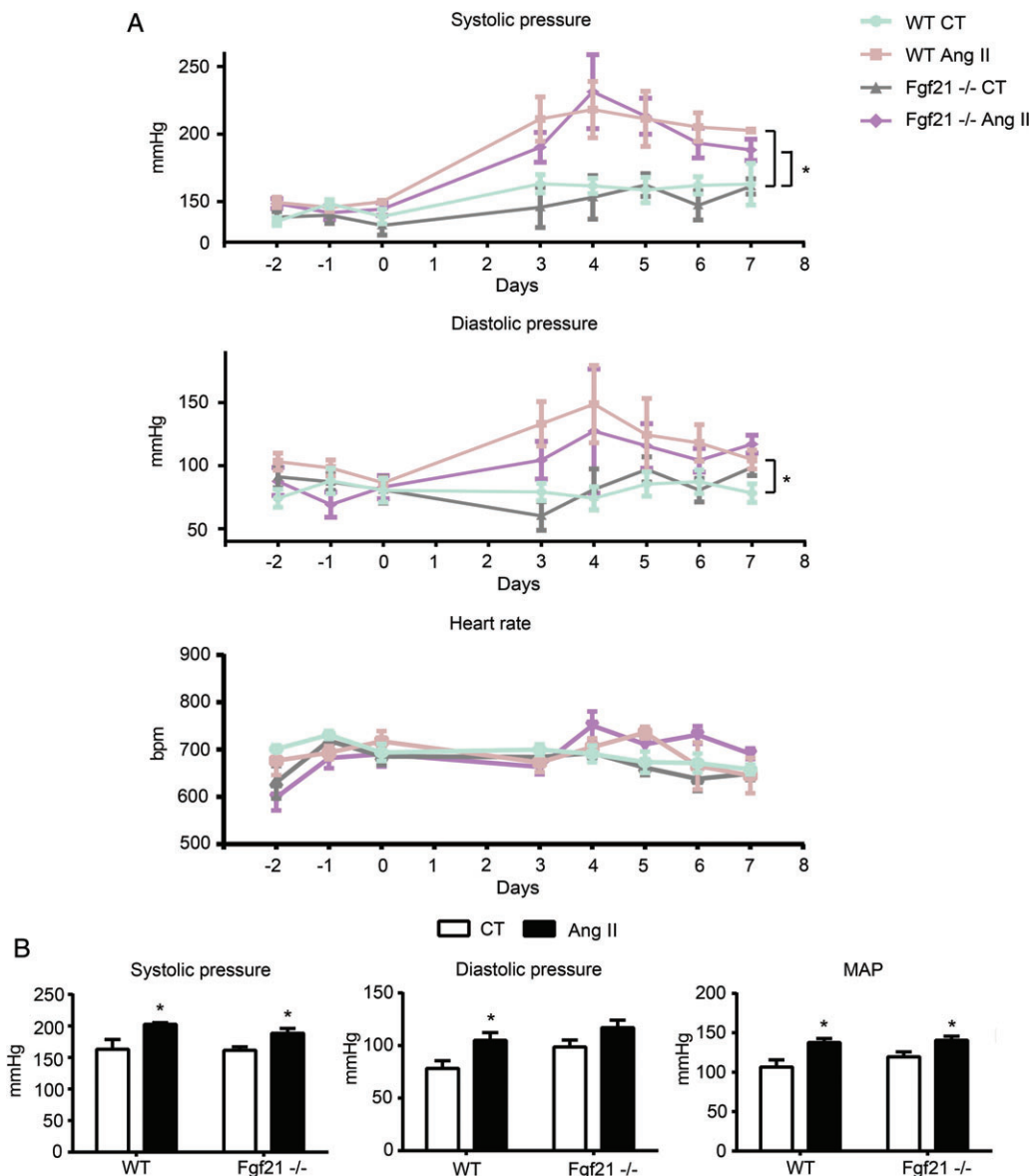


Figure 2. Heart rate and blood pressure in WT and *Fgf21*^{-/-} mice after AngII-induced hypertensive heart disease. Hypertensive heart disease was experimentally induced by continuously infusing adult WT and *Fgf21*^{-/-} mice with AngII for 7 days; control mice (CT) were infused with PBS. (A) Evolution of the systolic and diastolic blood pressure and heart rate all over the course of the experiment. (B) Systolic, diastolic and MAP at the end of the experiment (day 7). Results are presented as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group; * $p < 0.05$ compared with the corresponding CT mice).

AngII treatment in both WT and *Fgf21*^{-/-} mice. Surprisingly, we did not observe an exacerbated enlargement of the heart due to the lack of Fgf21. We found a significant increase in the HW/TL ratio in *Fgf21*^{-/-} mice treated with AngII but to the same extent observed in WT mice. Next, we analyzed the pathologic markers of cardiac hypertrophy, atrial natriuretic factor (ANF) and brain natriuretic factor (BNF) (Figure 3B). We observed that the mRNA expression levels of *Anf* were significantly increased after AngII treatment but to the same extent in both genotypes, however the *Bnf* was significantly increased only in *Fgf21*^{-/-} mice subjected to AngII infusion. Considering that FGF21 protects against oxidative stress in the heart [18] and that AngII is a well-known stimulant of the NADPH oxidase system,

leading to oxidative stress [28], we analyzed cardiac genes encoding proteins involved in the antioxidant pathways, including superoxide dismutase-2 (SOD2) and catalase (CAT) in these hearts (Figure 3C). We found that, in basal conditions, *Fgf21*^{-/-} mice already have significantly lower expression levels of *Cat* and, after AngII treatment, the mRNA expression levels of both *Sod2* and *Cat* were significantly downregulated in mice lacking Fgf21, suggesting impaired protection against oxidative stress.

Echocardiographic measurements (Figure 3D and see supplementary material, Table S1) revealed that both the EF and the fractional shortening (FS) were significantly reduced in hypertensive *Fgf21*^{-/-} mice, compared to their corresponding non-hypertensive controls, indicating a clear cardiac dysfunction in AngII-treated

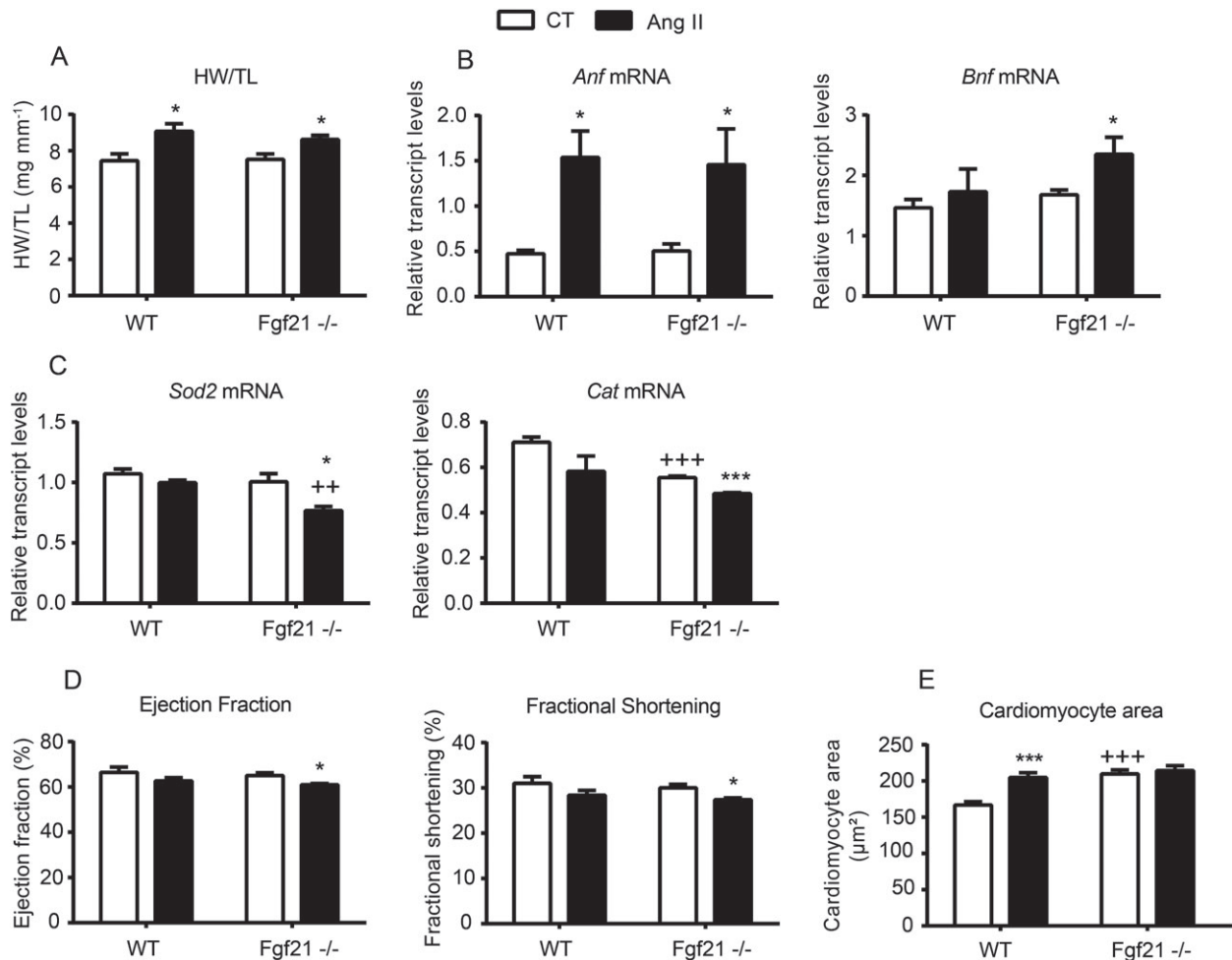


Figure 3. Hypertension-induced cardiac hypertrophy is enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice. Hypertensive heart disease was experimentally induced by continuously infusing adult WT and *Fgf21*^{-/-} mice with AngII for 7 days; control mice (CT) were infused with PBS. (A) Heart weight (mg) to tibia length (mm) in CT and AngII-treated WT and *Fgf21*^{-/-} mice. (B) mRNA expression levels of the hypertrophy markers *Anf* and *Bnf*. (C) mRNA expression levels of the oxidative stress genes *Sod2* and *Cat*. (D) Echocardiography data from WT and *Fgf21*^{-/-} mice treated with AngII. FS, Fractional shortening. (E) Quantification of cardiomyocyte size in left ventricular cardiac tissue determined by H&E staining. Results are presented as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group; * $p < 0.05$ compared with the corresponding CT mice, and + $p < 0.05$ compared with the corresponding WT mice).

Fgf21^{-/-} mice. By contrast, no differences in EF or FS were found in hypertensive WT mice. Moreover, the relative wall thickness (RWT) was significantly increased in hypertensive WT mice but not in hypertensive *Fgf21*^{-/-} mice, indicating concentric hypertrophy in WT mice and some degree of eccentric hypertrophy/dilatation in *Fgf21*^{-/-} mice subjected to AngII treatment. No difference was found in the end systolic and diastolic volumes (ESV and EDV), and the posterior wall thickness (PWT) in any of the groups. Regarding the LV internal diameter (LVID), was significantly reduced only in the AngII-treated WT mice compared to their corresponding non-treated mice. Finally, the internal ventricular septum (IVS) was significantly increased only in *Fgf21*^{-/-} mice subjected to AngII treatment.

Next, we analyzed the cross-sectional area of cardiomyocytes in heart sections (Figure 3E). Under basal conditions, *Fgf21*^{-/-} mice exhibited a greater cardiomyocyte area relative to WT mice. AngII treatment significantly increased the area of cardiomyocytes in

WT mice compared with that in control WT mice, and caused a slight increase in *Fgf21*^{-/-} mice compared with untreated control *Fgf21*^{-/-} mice.

Taken together, these results indicate that AngII-treated WT mice exhibit a compensatory concentric cardiac hypertrophy, whereas hypertensive *Fgf21*^{-/-} mice develop eccentric hypertrophy followed by cardiac dysfunction.

Cardiac fibrosis is enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice after AngII-induced hypertensive heart disease

Fibrosis, which develops in the heart under pathological conditions, is considered one of the major features of hypertensive heart disease [4,5]. To assess fibrosis in hearts from WT and *Fgf21*^{-/-} mice we stained tissue samples for collagen using Masson's Trichrome staining and analyzed samples for mRNA expression analysis of Collagen 3 (*Col3a1*), transforming growth factor beta (*Tgfb1*) and collagen 6a1 (*Col6a1*) (Figure 4). We observed a significant increase in the expression levels

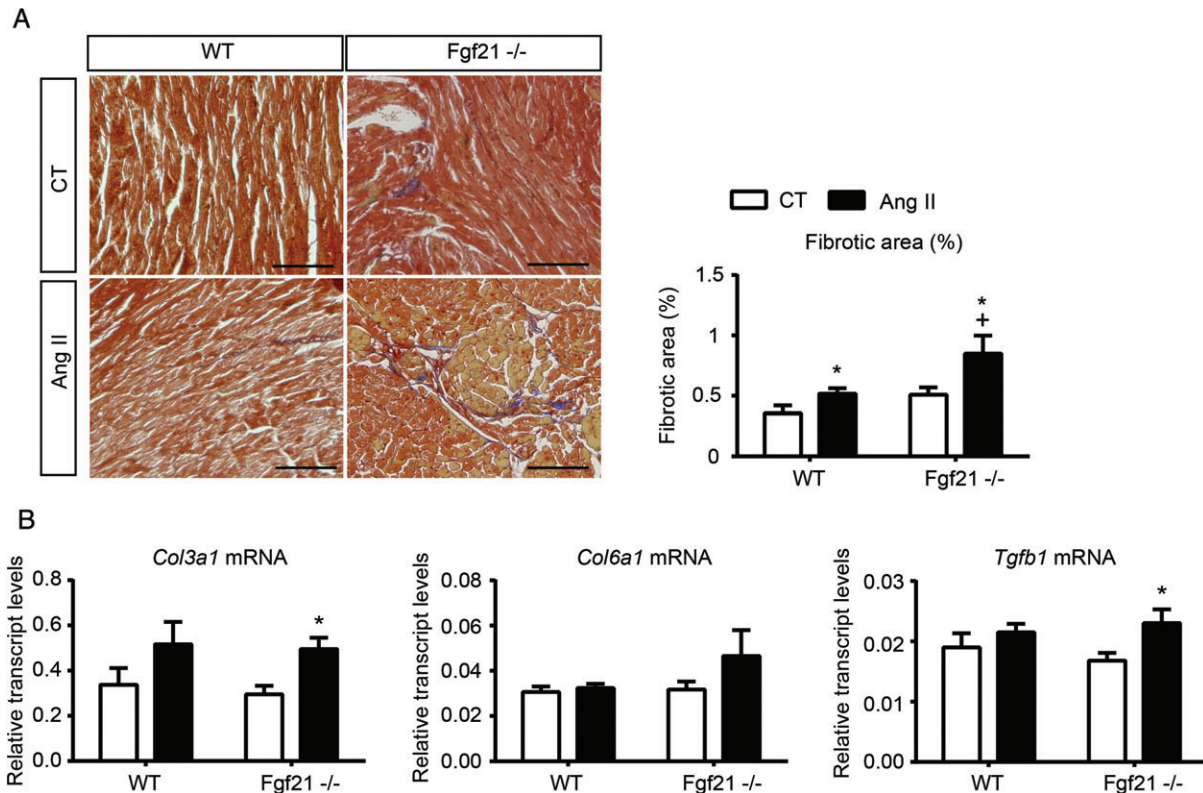


Figure 4. Hypertension induces fibrosis in an FGF21-dependent manner. Hypertensive heart disease was experimentally induced by continuously infusing adult WT and *Fgf21*^{-/-} mice with AngII for 7 days; control mice (CT) were infused with PBS. (A) Representative images showing Masson's Trichrome staining (left) and quantification of left ventricular fibrotic areas, shown as positively-stained areas divided by total area of the heart section (right). Scale bar: 200 μ m. (B) mRNA expression levels of the fibrotic markers *Col3a1*, *Col6a1*, and *Tgfb1*. Results are presented as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group; * $p < 0.05$ compared with the corresponding CT mice, and + $p < 0.05$ compared with the corresponding WT mice).

of *Col3a1*, *Col6a1*, and especially *Tgfb1*, the master regulator of fibrosis, in the hearts from AngII-infused *Fgf21*^{-/-} mice, but not in WT mice infused with AngII (Figure 4B). An analysis of hearts by Masson's Trichrome staining showed evidences of some fibrosis in hypertensive WT mice, but showed a significant increase in fibrotic areas in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice after AngII-treatment (Figure 4A) compared with hypertensive WT mice. On the basis of these results, we conclude that development of hypertensive heart disease in *Fgf21*^{-/-} mice is associated with enhanced cardiac fibrosis.

FGF21 protects against cardiac fibrosis *in vivo* and *in vitro*

The higher degree of cardiac fibrosis in *Fgf21*^{-/-} mice following exposure to different stimuli has been extensively reported [18,19,29,30]. However, whether the presence of this enhanced fibrosis is a direct cause of the lack of FGF21 or an indirect consequence of overt cardiac damage has not been studied. In order to assess direct effects of FGF21 on fibrosis, we exploited CFs derived from rat neonatal hearts as an *in vitro* model. As reported previously [22], rat CFs cultured on a rigid substrate show progressive fibroblast-to-myofibroblast differentiation, such that passage 1 (P1) cells are

considered CFs and passage 3 (P3) cells are considered cardiac myofibroblasts (CMFs), based on the marked increase in α -SMA (*Acta2*). Consistent with the reported suitability of this *in vitro* model for studying the development of cardiac fibrosis, we confirmed that mRNA and protein levels of α -SMA were increased in P3 cells compared with P1 cells. We then analyzed the mRNA expression levels of *Fgf21* and the FGF21 receptors *Fgfr1* and *Fgfr4* in CFs and CMFs (Figure 5A). We found that *Fgf21* expression levels were significantly higher in cultured neonatal cardiomyocytes (NCMs) than in CFs or CMFs. We further found that both *Fgfr1* and *Fgfr4* mRNAs were expressed at higher levels in CFs and CMFs compared with NCMs, whereas levels of the co-receptor *Klb* were similar among CFs, CMFs, and NCMs. These data indicate that both CFs and CMFs are potential targets of FGF21. Next we treated CFs and CMFs with FGF21 (Figure 5B), and found that FGF21 significantly reduced α -SMA protein and *Acta2* mRNA levels in CMFs, indicating that FGF21 is able to blunt cardiac fibrosis in this *in vitro* model.

We then performed *in vivo* experiments in a mouse model of ISO-induced cardiac fibrosis development by treating ISO-injected mice with FGF21 for 7 days (Figure 5C), as previously reported [19]. We found clear evidence that FGF21 protected against fibrosis development in ISO-induced cardiac fibrosis model mice,

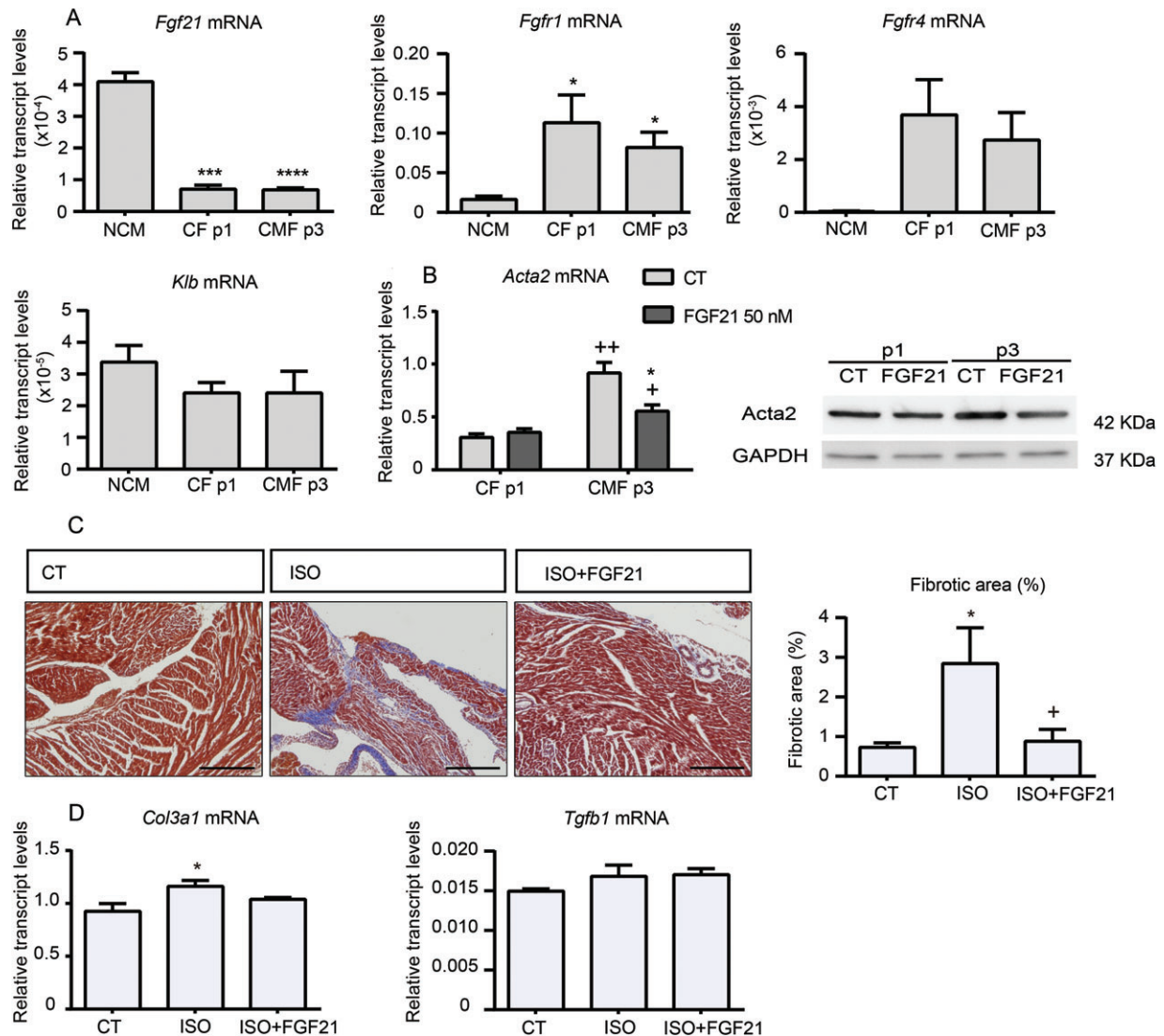


Figure 5. FGF21 protects against cardiac fibrosis. (A) mRNA expression levels of *Fgf21*, *Fgfr1*, *Fgfr4* and *Klb* in neonatal rat cardiomyocytes (NCMs) and neonatal rat CFs passage 1 (CF, P1) and passage 3 (CMF, P3). (B) P1 and P3 neonatal rat CFs were treated with 50 nM FGF21 for 24 h, after which α -SMA (*Acta2*) mRNA (left) and protein levels (right) were analyzed. Protein levels were assessed by western blotting. GAPDH was used as loading control. Results are presented as means \pm SEM ($p < 0.05$ compared with the corresponding CT cells, and $+p < 0.05$ compared with the corresponding CF P1 cells). Each experiment was conducted in triplicate using at least two independent cardiomyocyte isolations. (C) Cardiac fibrosis was induced by injecting WT mice (i.p.) with ISO, alone or together with FGF21, for 7 days. Representative images showing fibrotic areas in left ventricular (LV) cardiac tissue, detected by Masson's Trichrome staining (left), and quantification of LV fibrotic areas, shown as positively-stained areas divided by total area of the heart section (right). Scale bar: 200 μ m. (D) mRNA expression levels of the fibrotic markers *Col3a1* and *Tgfb1*. Results are presented as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group; $p < 0.05$ compared with the corresponding CT mice, and $+p < 0.05$ compared with the corresponding ISO-treated mice).

assessed by Masson's Trichrome staining and mRNA expression analysis of *Col3a1*.

Collectively, these data indicates that FGF21 protects against cardiac fibrosis *in vitro* and *in vivo*.

FGF21 expression is upregulated in the human heart of hypertensive heart donor patients

Finally, we analyzed cardiac samples from heart donor healthy normotensive individuals (controls) and hypertensive patients developing or not cardiomyopathy. The main epidemiological and clinical data for cases and controls are summarized in supplementary material, Table S2. Mean age ranged from 58 to 60 years old and

was similar between groups, and there were no significant differences in gender distribution. A histological analysis of LV biopsies showed that all normotensive donors presented normal or minimally altered ventricular histology. Among the main histological findings in hypertensive donors were cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis, which were most prominent in hypertensive donors with cardiomyopathy compared to normotensive controls.

A subsequent analysis of FGF21 expression in these hearts by immunohistochemistry revealed that FGF21 staining intensity was low in sarcolemmal areas of cardiomyocytes in control hearts (Figure 6A). In contrast, hypertensive donors showed a significantly increase in

Fgf21 protects against cardiac fibrosis

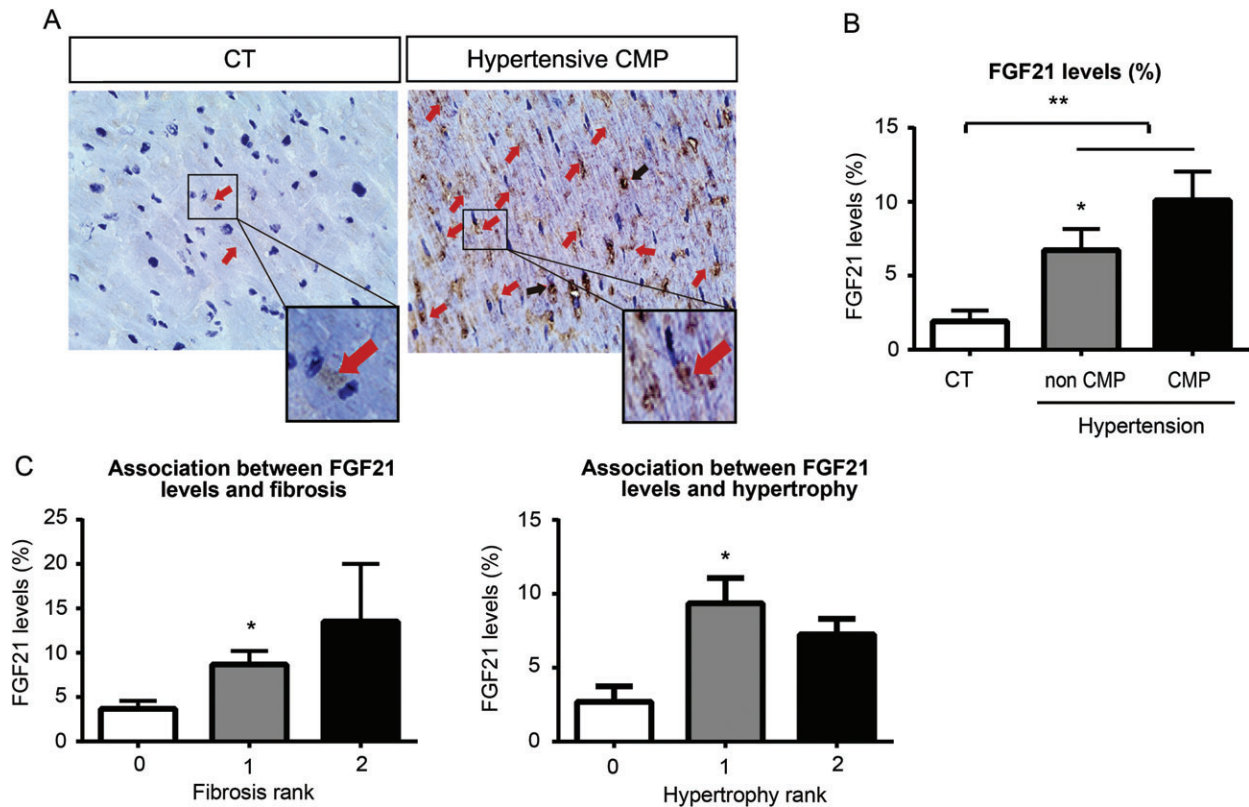


Figure 6. FGF21 is increased in the hypertensive myocardium in humans. (A) Representative images of myocardial samples from normotensive human control donor (left) and a hypertensive donor affected by cardiomyopathy (CMP; right), immunostained for FGF21. Red arrows indicate positive cytoplasmic staining (brown) and black arrows indicate perinuclear staining (brown). (B) Quantification of protein levels of FGF21 in myocardial samples from control donors (CT), patients suffering from hypertension without CMP (non-CMP), and patients with hypertension that developed CMP (CMP). (C) Correlation between FGF21 protein levels and fibrosis (left) and hypertrophy (right). Fibrosis and hypertrophy ranks were defined on a scale of 0–2, as follows: 0, no effect; 1, mild effect; and 2, large effect. Results are presented as means \pm SEM ($p < 0.05$ compared with the control group or 0 group).

FGF21 staining specially in the cytoplasmic areas of cardiomyocytes. As shown in Figure 6B, FGF21 protein levels were significantly higher in heart tissue from hypertensive donors, especially those that developed cardiomyopathy compared with control hearts. Interestingly, FGF21 protein levels in the myocardium were correlated with the degree of cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis (Figure 6C).

Discussion

Despite intensive studies on the role of FGF21 in many diseases, the role of FGF21 in hypertension has scarcely been investigated. Our study showed that circulating FGF21 levels in mice and FGF21 myocardial expression in mice and in humans increase during hypertension. In this context, it has previously been reported that circulating levels of FGF21 are elevated in patients with hypertension [8,9], an increase that possibly reflects a body's defensive mechanism that serves to prevent hypertension-associated diseases, such as hypertensive heart disease. In support of this idea it has been shown that increased FGF21 acts as a compensatory mechanism to protect against other diseases [31,32]. In

mice, increases in circulating FGF21 levels are associated with enhanced expression of FGF21 in the liver. Considering the greater extent of FGF21 expression in the liver relative to other tissues, and experimental evidence that the liver has a main role in producing systemic FGF21 [29,33], the liver is likely to account for the hypertension-related increase in FGF21 levels, in agreement with previous reports [10]. Moreover, we found that, unlike Pan *et al* [10] who previously reported exacerbated hypertensive effects in mice lacking FGF21, our treatment did not cause an overt hypertensive response in *Fgf21*-deficient mice. The age of the animals, older in our experiment, or the different mouse strain could explain the discrepancy between both experiments. Thus, our treatment allowed us to study the direct role of FGF21 deficiency during hypertensive heart disease without changes in blood pressure between genotypes.

The FGF21 anti-hypertensive effect has been attributed to the ability of FGF21 to cross the blood brain barrier and act centrally [34] to produce secondary vasoactive molecules, such as corticosterone, involved in the suppression of hypertension [35]. Despite the anti-hypertensive role of FGF21 seems clear in rodents, recent studies have reported conflicting data in humans, ranging from no adverse effects of FGF21 analogue

administration [36,37] to a pro-hypertensive adverse role of FGF21 [38]. More clinical studies are needed in order to clarify the exact role of FGF21 derivatives in humans.

In contrast to almost all extra-hepatic tissues, we found that FGF21 expression was induced in the hearts of mice and was strongly induced in hypertensive human hearts in the absence of cardiomyopathy, although it was maintained at high levels and was even enhanced in the presence of cardiomyopathy. Although we cannot rule out the possibility that the heart might contribute to circulating levels of FGF21, the relatively low expression of FGF21 in the heart compared with that in the liver [19] makes it unlikely that the hypertension-related upregulation of systemic FGF21 is primarily of cardiac origin. We also show that, in addition to increased expression of FGF21, the heart shows signs of enhanced FGF21 action during hypertension through substantial upregulation of β -klotho, a co-receptor required for the biological action of FGF21. Thus, during hypertension, the heart appears to be highly sensitive to and is targeted by FGF21 of systemic and/or local origin. This up-regulation of FGF21 is maintained and somehow increased during the development of hypertensive cardiomyopathy.

We previously reported that the heart is both a target of systemic FGF21 and a local source of FGF21, and showed that FGF21 acts as a protective cardiokine in response to insults such as oxidative stress and pathological cardiac events (e.g. cardiac remodeling) [18,19]. It is likely that local autocrine or paracrine effects are involved in our model of hypertensive heart disease. Cardiomyocytes are the main source of cardiac FGF21 and autocrine effects have been previously described by our group [19]. In the current study, we found that CFs produce little FGF21, but are direct targets of FGF21, supporting a paracrine role of the FGF21 produced locally in the heart on CFs. Confirmation of a paracrine role of cardiac FGF21 *in vivo* will require further experimental research using tissue-specific loss-of-function models.

One of the main features of hypertensive heart disease is the extensive development of cardiac fibrosis [4,5]. In fact, replacement of cardiac muscle by fibrotic tissue is thought to be at the pathogenic nidus of heart failure. We showed an accelerated development of cardiac fibrosis in *Fgf21*-deficient mice, especially after AngII infusion, without an exacerbated increase in blood pressure. We also confirmed that significantly increased cardiac fibrosis is associated with hypertension in humans, and demonstrated a direct relationship between myocardial expression of FGF21 and the degree of cardiac fibrosis. We further showed that FGF21 is able to reverse the myofibroblast phenotype *in vitro* and *in vivo*, indicating direct protective effects. These observations suggest a potential mechanism and predict that FGF21 could be a therapeutic tool for preventing or reversing pathological cardiac fibrosis.

In summary, we herein show that FGF21 targets the heart and protects against hypertensive heart disease, especially against fibrosis development.

Acknowledgements

This work was supported by SAF2014-55702-JIN and SAF2017-85722-R from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), Generalitat de Catalunya (2014SGR-141), by Fundació la Marató de TV3 201533/30-31 and Sociedad Española de Cardiología (SEC). AP is supported by a RYC-2014-16572 fellowship. We thank A. Però and M. Morales for technical support.

Author contributions statement

AP, FV and JFS conceived and designed the experiments. GFC, IRA, and CR performed the experiments on animals. AMS and MS performed echocardiography. MGM, GG and JFS performed the experiments on humans. AP, JFS, and FV analyzed the data. AP and JFS written the paper.

References

1. Bromfield S, Muntner P. High blood pressure: the leading global burden of disease risk factor and the need for worldwide prevention programs. *Curr Hypertens Rep* 2013; **15**: 134–136.
2. Levy D, Larson MG, Vasan RS, et al. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; **275**: 1557–1562.
3. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, et al. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation* 1998; **97**: 48–54.
4. Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 2011; **123**: 327–334.
5. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007; **117**: 568–575.
6. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 349–363.
7. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002; **39**: 258–263.
8. Semba RD, Crasto C, Strait J, et al. Elevated serum fibroblast growth factor 21 is associated with hypertension in community-dwelling adults. *J Hum Hypertens* 2013; **27**: 397–399.
9. Zhang X, Hu Y, Zeng H, et al. Serum fibroblast growth factor 21 levels is associated with lower extremity atherosclerotic disease in Chinese female diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* 2015; **14**: 32.
10. Pan X, Shao Y, Wu F, et al. FGF21 prevents angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction by activation of ACE2/angiotensin-(1-7) axis in mice. *Cell Metab* 2018; **27**: 1323–1337.
11. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 2007; **5**: 426–437.
12. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007; **5**: 415–425.
13. Muise ES, Azzolina B, Kuo DW, et al. Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* 2008; **74**: 403–412.

Fgf21 protects against cardiac fibrosis

14. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, *et al.* FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 2008; **582**: 3805–3810.
15. Hondares E, Iglesias R, Giralt A, *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2011; **286**: 12983–12990.
16. Kharitononkov A, Dunbar JD, Bina HA, *et al.* FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 1–7.
17. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, *et al.* Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26687–26695.
18. Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res* 2015; **106**: 19–31.
19. Planavila A, Redondo I, Hondares E, *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* 2013; **4**: 2019.
20. Liu SQ, Roberts D, Kharitononkov A, *et al.* Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci Rep* 2013; **3**: 2767.
21. Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, *et al.* FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **459**: 124–130.
22. Teunissen BE, Smeets PJ, Willemsen PH, *et al.* Activation of PPARdelta inhibits cardiac fibroblast proliferation and the trans-differentiation into myofibroblasts. *Cardiovasc Res* 2007; **75**: 519–529.
23. Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-kappa B activation. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1687**: 76–83.
24. Fernandez-Sola J, Borrissier-Pairo F, Antunez E, *et al.* Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors. *J Hypertens* 2015; **33**: 851–858.
25. Wang R, Wang Y, Lin WK, *et al.* Inhibition of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and associated ventricular arrhythmias by a p21 activated kinase 1 bioactive peptide. *PLoS One* 2014; **9**: e101974.
26. Adams AC, Coskun T, Cheng CC, *et al.* Fibroblast growth factor 21 is not required for the antidiabetic actions of the thiazolidinediones. *Mol Metab* 2013; **2**: 205–214.
27. Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1627–1635.
28. Lassegue B, San MA, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012; **110**: 1364–1390.
29. Redondo-Angulo I, Mas-Stachurska A, Sitges M, *et al.* Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy. *Cardiovasc Res* 2017; **113**: 1574–1584.
30. Ruperez C, Lerin C, Ferrer-Curriu G, *et al.* Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2018; **260**: 163–170.
31. Ye D, Wang Y, Li H, *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1alpha-mediated antioxidant capacity in mice. *Hepatology* 2014; **60**: 977–989.
32. Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JG, *et al.* FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis. *Endocrinology* 2012; **153**: 2689–2700.
33. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, *et al.* Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010; **11**: 206–212.
34. Owen BM, Ding X, Morgan DA, *et al.* FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab* 2014; **20**: 670–677.
35. Liang Q, Zhong L, Zhang J, *et al.* FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes* 2014; **63**: 4064–4075.
36. Talukdar S, Zhou Y, Li D, *et al.* A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab* 2016; **23**: 427–440.
37. Gaich G, Chien JY, Fu H, *et al.* The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* 2013; **18**: 333–340.
38. Kim AM, Somayaji VR, Dong JQ, *et al.* Once-weekly administration of a long-acting fibroblast growth factor 21 analogue modulates lipids, bone turnover markers, blood pressure and body weight differently in obese people with hypertriglyceridaemia and in non-human primates. *Diabetes Obes Metab* 2017; **19**: 1762–1772.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary figure legends

Figure S1. Characterization of the FGF21 system during hypertension

Table S1. Characterization of WT and Fgf21^{-/-} mice after 7 days of AngII infusion

Table S2. Clinical data of patients

Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease

Ferrer-Curriu *et al. J Pathol* DOI: 10.1002/path.5226

	Wt-CT	Wt-AngII	Fgf21 ^{-/-} -CT	Fgf21 ^{-/-} -AngII
Body weight (g)	23.51±0.36	23.05± 0.31	22.69±0.55	22.11±0.52
Triglycerides (mg/dl)	153.6± 11.4	176.2±21.5	155.6±19.8	191± 15.8
Glucose (mg/dl)	148.4±3.4	147.6±10.09	148.6± 4.5	151± 9.8
LVPWs (mm)	0.83±0.06	0.88±0.02	0.92±0	0.89±0.07
LVPWd (mm)	0.61±0.02	0.63±0.02	0.6±0.05	0.63±0.03
LVIDs (mm)	2.8±0.04	2.6±0.07*	2.7±0.06	2.8±0.04 ⁺
LVIDd (mm)	4.08±0.04	3.66±0.15*	3.9±0.1	3.88±0.13
IVSs (mm)	0.95±0.008	0.96±0.05	0.89±0.06	0.85±0.02
IVSd (mm)	0.63±0.016	0.66±0.026	0.57±0.021 ⁺	0.67±0.03*
ESV (mm³)	1.4±0.2	1.4±0.13	1.5±0.08	1.6±0.36
EDV (mm³)	0.55±0.05	0.59±0.07	0.55±0.13	0.61±0.08
RWT	0.3±0.01	0.35±0.02*	0.3±0.03	0.32±0.02

Supplementary Table S1. Characterization of wild-type and Fgf21^{-/-} mice after 7 d of Ang II infusion.

Hypertensive heart disease was experimentally induced by continuously infusing adult wt and Fgf21^{-/-} mice with AngII for 7 d; control mice (CT) were infused with PBS.

LVPWs and LVPWd, left ventricle posterior wall during systole and diastole; LVIDs and LVIDd, LV internal diameter during systole and diastole; IVSs and IVSd, internal ventricular septum during systole and diastole; ESV, end-systolic volume; EDV, end-diastolic volume; RWT, Relative wall thickness. All measurements are means ± SEMs (n=5 mice/group; *p<0.05 compared with the corresponding CT mice, and ⁺p<0.05 compared with the corresponding wt mice).

Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease
 Ferrer-Curriu *et al. J Pathol* DOI: 10.1002/path.5226

Supplementary Table S2. Clinical data of patients

Parameters	Control N = 9	Hypertension		Significance P value
		Non CMP N= 10	CMP N=18	
Age (years)	58.50±4.07	58.00±5.46	60.56±2.94	NS
Gender	75% female 25% male	50% female 50% male	33% female 67% male	NS
Hypertrophy	90.9% rank 0 9.1% rank 1 0% rank 2	9.1% rank 0 90.0% rank 1 0% rank 2	5.3% rank 0 63.2% rank 1 57.9% rank 2	p<0.05*
Fibrosis	77.8% rank 0 22.2% rank 1 0% rank 2	40.0% rank 0 50.0% rank 1 10% rank 2	22.2% rank 0 55.6% rank 1 22.2% rank 2	NS

Clinical data from control donors, patients suffering from hypertension without CMP

(non CMP), and patients with hypertension that developed CMP (CMP). Case-control differences were sought by non-parametric statistical analysis. Fibrosis and hypertrophy ranks were defined on a scale of 0–2, as follows: 0, no effect; 1, mild effect; and 2, large effect. Results are presented as mean ± SEM (* p<0.05 compared with the control group).

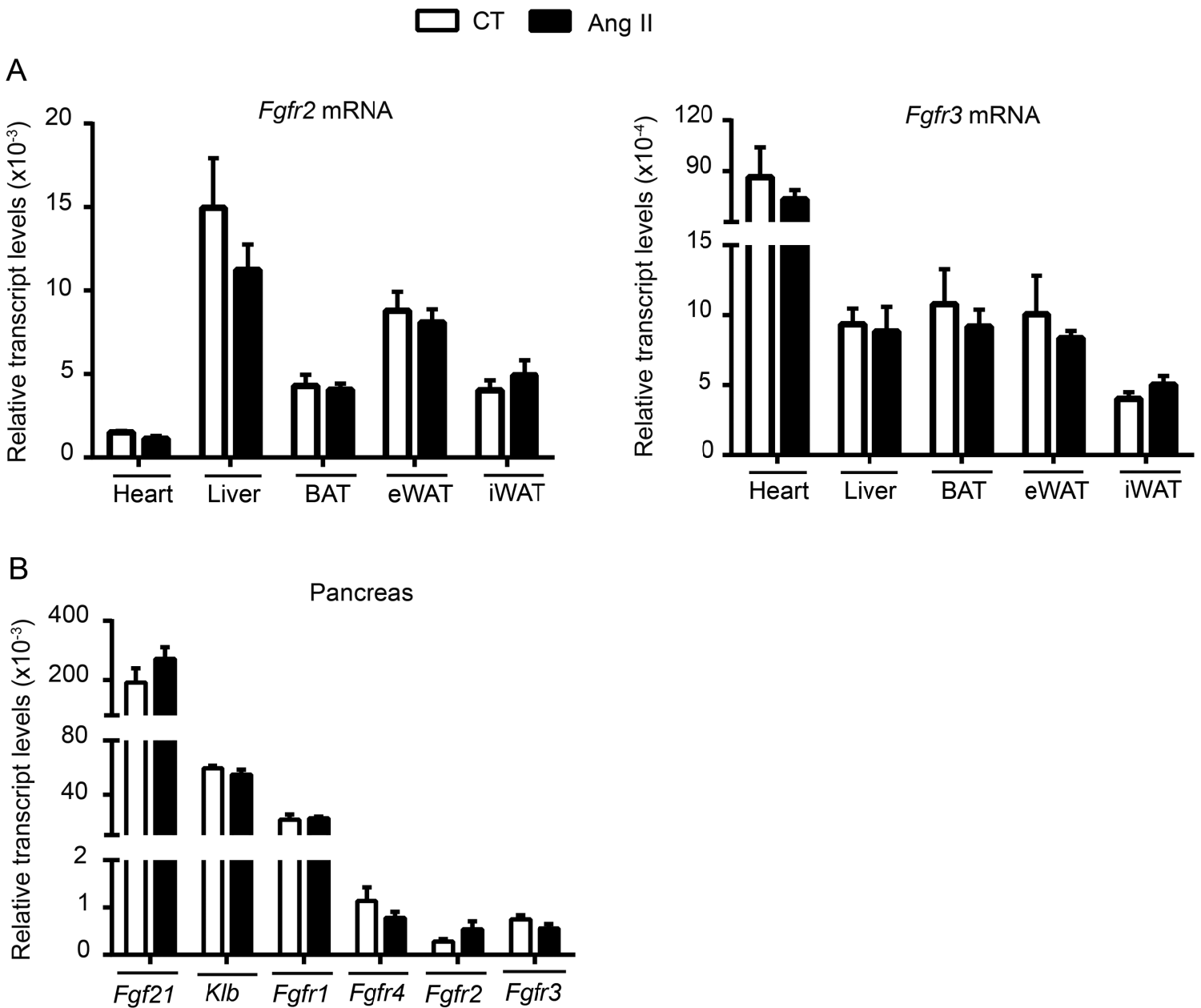


Figure S1. Characterization of the FGF21 system during hypertension. Hypertensive heart disease was experimentally induced by continuously infusing adult wt mice with AngII for 7 d. (A) mRNA expression levels of *Fgfr2* and *Fgfr3* in heart, liver, BAT, eWAT and iWAT in control and AngII wt mice. (B) mRNA expression levels of *Fgf21*, *Klb*, *Fgfr1*, *Fgfr4*, *Fgfr2* and *Fgfr3* in pancreas. Results are presented as mean \pm SEM (n=5 mice/group)

The protective effect of Fibroblast growth factor 21 in alcoholic cardiomyopathy: is there a role on mitochondrial dysfunction?

Revista: Journal of Pathology

PMID: enviat

Títol: Paper protector de FGF21 en la cardiomiopatia alcohòlica: possible rol en la disfunció mitocondrial?

Resum:

Objectius: La cardiomiopatia alcohòlica està produïda per un consum abusiu i crònic d'alcohol i és un dels principals factors implicats en el desenvolupament d'insuficiència cardíaca i de mortalitat cardiovascular. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) és un conegut factor cardioprotector. En aquest estudi volem investigar el paper de FGF21 en un model animal amb dany cardíac induït pel consum crònic d'alcohol i en pacients amb alcoholisme.

Materials i resultats: Els nivells circulants de FGF21 i l'expressió proteica de FGF21 i β -klotho estan augmentats en pacients amb alcoholisme. Com a model experimental de cardiomiopatia alcohòlica, vam alimentar ratolins *wild type* (WT) i ratolins deficients amb FGF21 (Fgf21 $-/-$) amb una dieta líquida amb un 4% d'alcohol durant 12 setmanes. Els nivells circulants de FGF21 i l'expressió gènica en el miocardi van augmentar en ratolins WT després de la ingesta crònica d'alcohol. Els ratolins Fgf21 $-/-$ van desenvolupar un major grau d'hipertrofia cardíaca, fibrosis i disfunció diastòlica després del consum crònic d'alcohol en comparació amb els ratolins WT. A més a més, el miocardi dels ratolins Fgf21 $-/-$ mostrava senyals de desregulació metabòlica, estrès oxidatiu i disfunció mitocondrial després de la ingesta crònica d'alcohol els qual van ser compensats amb un augment dels gens antioxidants en el cor. Finalment, les biòpsies cardíques de pacients amb alcoholisme i que presenten cardiomiopatia alcohòlica presenten un major grau d'estrès oxidatiu el qual correlaciona positivament amb els nivells de FGF21 en el miocardi.

Conclusions: aquest estudi mostra com el consum crònic d'alcohol indueix l'expressió de FGF21. A més, la manca de FGF21 agreuja el dany cardíac produït per la cardiomiopatia alcohòlica, apuntant així a FGF21 com un agent cardioprotector contra la cardiomiopatia produïda per l'alcohol.

The protective effect of Fibroblast growth factor-21 in Alcoholic Cardiomyopathy: is there a role on mitochondrial dysfunction?

Ferrer-Curriu G.^{1,2#}, Guitart-Mampel M.^{3#}, Crispi F⁴, Villarroya F.^{1,2}, Garrabou G.³, Fernández-Solà J.⁵ and Planavila A.^{1,2*}

¹Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular. Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

²CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain.

³Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine and Health Science - University of Barcelona, Internal Medicine Service - Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona and CIBERER, Spain.

⁴Fetal i+D Fetal Medicine Research Center, BCNatal -Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine (Hospital Clínic and Hospital San Joan de Déu), Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁵Alcohol Unit, Department of Medicine – Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Both authors contributed equally to this work

* To whom correspondence should be addressed: Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028-Barcelona. Spain. Tel. 34-93-4021210; Fax: 34-93-4021559; E-mail: aplanavila@ub.edu

ABSTRACT

Aims: Alcoholic cardiomyopathy (ACM) resulting from chronic alcohol misuse is one of the main contributors leading to heart failure and cardiovascular mortality. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a well-known cardioprotective factor. We aimed to study the role of FGF21 in experimentally-induced and clinical cardiac damage due to chronic alcohol consumption.

Methods and Results: FGF21 circulating levels and cardiac FGF21 and β -klotho protein levels were increased in chronic alcoholic patients. As an experimental model of ACM, we fed wild type (wt) and Fgf21 knockout (*Fgf21*^{-/-}) mice with a 4% alcohol liquid diet for 12 weeks. FGF21 circulating levels and expression levels in the myocardium were also increased in wt mice after chronic alcohol intake. *Fgf21*^{-/-} mice develop a higher degree of cardiac hypertrophy, fibrosis and diastolic dysfunction after chronic alcohol consumption than wt mice. Moreover, the myocardium of *Fgf21*^{-/-} mice showed signs of metabolic deregulation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction after alcohol intake which are compensated by an increase in anti-oxidant genes in the heart. Finally, human cardiac biopsies from alcoholic patients developing ACM present a higher degree of oxidative stress which positively correlates with the FGF21 protein levels in the myocardium.

Conclusions: The present results show that FGF21 expression is induced by chronic alcohol consumption. In addition, the lack of FGF21 aggravates cardiac damage produced by ACM, thus pointing to FGF21 as a protective agent against alcohol-induced cardiomyopathy.

Key words: Mitochondria, FGF21, alcoholic cardiomyopathy, hypertrophy

INTRODUCTION

Alcoholic cardiomyopathy (ACM) is one of the main causes of non-ischemic dilated cardiomyopathy in Western countries¹. ACM is a specific heart disease produced by chronic and abusive alcohol intake which is characterized by dilated cardiomyopathy and impaired contraction¹⁻³. Chronic effects of alcohol on the heart are multi-factorial and cause several damages in the cardiomyocytes including disruption of calcium transients and homeostasis, protein synthesis, excitation-contraction coupling mechanisms, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. This situation leads to oxidative, energetic and structural cardiomyocyte damage leading ultimately to apoptosis and necrosis⁴. Finally, the remaining cardiomyocytes develop hypertrophy and progressive subendocardial and interstitial fibrosis⁴. Moreover ACM induces cardiac remodeling and progression to dilated cardiomyopathy with early diastolic dysfunction and progressive decreased left-ventricle ejection fraction⁴. Alcoholic patients present a significant increase of morbidity due to arrhythmias, heart failure and a mortality rate^{5,6}.

Alcohol and their metabolites are able to damage intracellular organelles through its direct binding to membrane phospholipids, ion channels, receptors and DNA⁷. Moreover, alcohol impairs mitochondrial function by decreasing expression of respiratory chain complexes⁸, decreasing membrane potential⁹ and altering mitochondrial DNA¹⁰. Moreover, alcohol inhibits mitochondrial biogenesis by preventing the formation of new functional mitochondria and therefore exacerbating mitochondrial damage^{8,11}.

Fibroblasts growth factor 21 (FGF21) is one of the most relevant cardiomyokines acting as a cardioprotective endocrine factor. The heart is both target and source of FGF21^{12,13} and acts in an autocrine/paracrine manner protecting against metabolic, oxidative and inflammatory cardiac

damage^{7, 14}. It has also been involved in protection against heart hypertrophy¹² and cardiac fibrosis¹⁵. The protective role of FGF21 on the heart has been described in different diseases including ischemic heart disease¹⁶, diabetic cardiomyopathy¹⁷ and other clinical situations^{18, 19}. Recently, FGF21 has been related to alcohol consumption. Some studies have shown that FGF21 circulating levels were increased after alcohol consumption²⁰ and in chronic alcoholic patients²¹. Moreover, it has been described that FGF21 also acts at the central nervous system (CNS) inhibiting alcohol preference in both mice and humans. FGF21 interacts with its co-receptor β -klotho (KLB) in certain areas of the brain causing a decrease dopamine levels and interfering with the hypothalamic reward system that finally inhibits the preference for alcohol^{22, 23}. In humans, FGF21 and KLB genetic variants are associated with increased alcohol intake. Therefore, it appears that FGF21 may be involved in the regulation of alcohol consumption in humans^{23, 24}. However the role of FGF21 in the alcoholic cardiomyopathy has not yet been explored.

The present study aims to evaluate the role of FGF-21 in alcohol-induced cardiac damage in an experimental animal model and in heart donor patients, considering that alcohol promotes cardiomyocyte hypertrophy, fibrosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Fgf21^{-/-} mice (B6N;129S5-Fgf21tm1Lex/Mmcd) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), an NCRR-NIH-funded strain repository, and were donated to the MMRRC by Genentech, Inc. Eight weeks old WT and FGF21^{-/-} male mice were initially fed ad libitum with Lieber De Carli liquid control diet 12 weeks with a caloric profile of 54.3% carbohydrate, 16.7% protein, 17.7% fat and 4.3% fiber (Bio-serv F1259SP, Flemington NJ). After the acclimation period, the ethanol concentration was gradually increased until reached the 4%

(vol/vol) in the ethanol group. As ethanol content was increased in the diet, maltose dextrin content (Bio-Serv F1697SP, Flemington NJ) was adjusted to keep the diet isocaloric. An isocaloric pairfeeding regimen was employed in which control group received the same quantity of diet that the ethanol group consumed the day before. Body weight and caloric intake were measured daily for 12 weeks.

All experiments were performed according to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament, and were approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Echocardiography measurement

Mice were anesthetized with 1.5% isoflurane and cardiac dimensions were assessed by echocardiography using a commercially available system (Vivid Q; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equipped with a 12-MHz linear probe. Ventricular dimensions were measured using M-mode scans across the left ventricle.

Heart histology

Heart was cut transversely at mid-height and fixed during 24-48 hours in 10% neutral-buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned. The sections were deparaffinized and stained with Trichrome Masson staining to determine the fibrotic area in the left ventricle (Panreac, Barcelona). Trichrome masson stained sections were analyzed quantitatively using Image J software.

Analysis of plasma metabolites and hormone levels

Fgf21 plasma levels were measured using a mouse/human FGF21 ELISA kit (Biovendor, Brno, Czech Republic).

Gene expression

Total RNA extraction from left ventricle was performed using Tripure (Roche, Indianapolis, IN, USA). Total RNA extraction from liver and adipose tissues (WAT) was performed using NucleoSpin RNA columns (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany). Reverse transcription of 0.5 µg total RNA to cDNA was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems). Cyclophilin A (PpiA) was used as an endogenous reference gene.

Humans samples

Hearts from donors under 70 years of age with brain death of cerebrovascular or traumatic origin were routinely evaluated for possible transplantation at the transplant unit of the Hospital Clínic. From these samples we selected: (i) 19 donors with a history of ethanol intake ≥ 60 g/day for more than 10 years (17 without CMP and 13 with CMP), and (ii) 11 control hearts from healthy people not eligible for implantation because of a lack of matched receptor or inadequate size. The study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (reference number HCB/2012/8005) and all the donor families provided informed consent for the use of myocardium tissue in this study. All procedures in patients follow the guidance provided in the Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal editors and Code of Conduct for Journal Publishers (COPE), as well as the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Human histological studies

Myocardial cell hypertrophy, as well as fibrosis, were evaluated by histological morphometry of each sample, as previously reported²⁵. Myocardial expression of FGF21 and KLB was measured

by immunostaining with an anti-FGF21 antibody (Abcam, Cambridge, UK) and anti-KLB antibody. Six areas of each sample were evaluated, and a total of 200–600 cells were assessed per field (≥ 1200 cells/sample). FGF21 and KLB expression index was calculated as the ratio of positive-stained to negative-stained myocytes. Immunohistochemical evaluations were performed by two independent evaluators.

Mitochondrial analysis

A piece of heart tissue was cryopreserved at -80°C and further homogenized (Caframo technologies, Ontario, Canada) at 5% (w/v) in mannitol buffer for mitochondrial analysis. The protein content was quantified using the bicinchoninic acid colorimetric assay (Thermo Scientific assay kit Prod #23225, Waltham, MA, USA) to normalize experimental measures.

Complex IV activity

The enzymatic activity of mitochondrial complex IV (CIV) in both human and animal heart were spectrophotometrically measured at 37°C . Absorbance changes of the enzymatic activities along time were monitored in a HITACHI U2900 spectrophotometer using the UV-Solution software version 2.2.

All enzymatic assays consisted of national standardized methods run in parallel with internal quality controls and all the enzymatic assays, measured once per sample, simultaneously included both cases and controls.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation, as an indicator of oxidative damage to lipid membranes, was performed using the BIOXYTECH® LPO-586™ assay by spectrophotometric measurement of malondialdehyde

(MDA) and 4-hydroxyalkenal (HAE) levels (both peroxides derived from fatty acid oxidation), according to the manufacturer's instructions (Oxis International Inc., CA, USA).

Western Blot analysis

Twenty µg of total protein homogenate of both human and mice heart were separated using 7/13% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (iBlot Gel Transfer Stacks, Life Technologies, Waltham, MA, USA). The membranes were hybridized with specific antibodies overnight at 4°C. The protein expression was normalized to GAPDH protein (37kDa; 1:50.000; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) which was used as a loading control. Inter-blot control samples were used to evaluate membrane variability. The ImageQuantLD program was used to quantify chemiluminiscence.

Expression of superoxid dismutase 2 (SOD2)

SOD2 is a mitochondrial anti-oxidant enzyme pivotal in ROS release during oxidative stress. Membranes were hybridized with anti-SOD2 (24kDa; for human samples 1:1000 from ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; for mice samples 1:500 from Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Results were expressed as the SOD2/GAPDH ratio.

Statistical analysis

The results are presented as means ± SEM. Data were analyzed using an unpaired t-test or one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test (for quantitative variables) or Fisher test (for dichotomous variables and contingency tables), as appropriate. Analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Characterization of the FGF21 system during chronic alcohol consumption in humans and mice

First, we analyzed cardiac and plasma samples from heart donor healthy individuals (controls) and alcoholic patients developing or not cardiomyopathy. The main epidemiological and clinical data for cases and controls are summarized in Supplemental Table S1. Mean age ranged from 51 to 58 years old and was similar between groups, and there were no significant differences in gender distribution. Analysis of the circulating levels of FGF21 in these patients revealed a significant increase of this protein in alcoholic versus non-alcoholic patients (Fig. 1A). A subsequent analysis of FGF21 expression in these hearts by immunohistochemistry revealed that FGF21 staining intensity was low in sarcolemmal areas of cardiomyocytes in control hearts (Fig 1B). In contrast, alcoholic donors showed a gradually and significantly increase in FGF21 staining in both perinuclear areas and cytoplasmatic areas of cardiomyocytes. FGF21 protein levels were significantly higher in heart tissue from alcoholic donors, especially those that developed cardiomyopathy compared with control hearts. Interestingly, the protein levels of the FGF21 co-receptor β -klotho in the myocardium were also significantly increased in the membranes of cardiomyocytes especially in hearts from alcoholic donors developing cardiomyopathy (Fig. 1C). Interestingly, FGF21 protein levels in the myocardium were correlated with the degree of cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis (Fig. 1D). These results indicate that FGF21 circulating levels and cardiac protein levels of FGF21 and β -klotho were increased in alcoholic patients.

Next, to further elucidate the role of FGF21 during chronic alcoholism, we moved to an experimental model where we fed mice with a liquid diet with 4% (vol/vol) ethanol content for 12 weeks, to induce alcoholic cardiomyopathy²⁶. First, we analyzed circulating levels of FGF21

during chronic ethanol consumption in wild-type (wt) mice. We found that plasma levels of FGF21 were significantly increased after 12 weeks of chronic alcohol intake (Fig. 2A). A subsequent analysis of *Fgf21* mRNA expression levels in the liver, epididymal white adipose tissue (eWAT), inguinal WAT (iWAT), brown adipose tissue (BAT), and heart revealed a significant induction in the liver and in the heart of mice drinking ethanol compared with CT mice, but showed no change in BAT or WAT (Fig. 2B). To further characterize FGF21 signaling during alcoholism, we next analyzed expression levels of mRNA encoding the FGF21 receptors, FGFR1 and FGFR4, and its co-receptor, β -klotho (KLB) (Fig. 2C). We found no significant changes in *Fgfr1* and *Fgfr4* mRNA levels in any of the tissues analyzed with the exception of BAT where *Fgfr1* was increased. Moreover, expression levels of *Klb* mRNA in WAT and BAT were also up-regulated after chronic alcohol intake and showed a tendency to increase in the myocardium.

These results collectively indicate that plasma protein levels and cardiac expression levels of FGF21 are increased during alcoholism in humans and in mice.

Lack of FGF21 impairs cardiac remodeling in alcoholic cardiomyopathy in mice

We next analyzed the impact of FGF21 deficiency on cardiac morphology after chronic alcohol intake in wt and *Fgf21*^{-/-} mice. As shown in Figure 3A, the heart weight/tibia length (HW/TL) ratio, a measure of cardiac enlargement, was significantly increased after chronic alcohol intake in wt and *Fgf21*^{-/-} mice. Surprisingly, we did not observe an exacerbated enlargement of the heart due to the lack of Fgf21. We found a significant increase in the HW/TL ratio in *Fgf21*^{-/-} mice after alcohol intake but to the same extent observed in wt mice. Next, we analyzed the pathologic markers of cardiac hypertrophy, atrial natriuretic factor (Anf) and brain natriuretic factor (Bnf) (Fig. 3B). We observed that the mRNA expression levels of *Anf* were significantly increased after alcohol intake in both genotypes but were significantly higher in *Fgf21*^{-/-} mice compared to wt

mice indicating a higher degree of cardiac damage in *Fgf21*^{-/-} mice. By contrast, *Bnf* expression levels were significantly increased only in *Fgf21*^{-/-} mice regardless of treatment.

Echocardiographic measurements (Table 1) revealed that both the ejection fraction (EF) and the fractional shortening (FS) were significantly reduced in *Fgf21*^{-/-} mice, compared to their corresponding wt mice, indicating a clear cardiac dysfunction in *Fgf21*^{-/-} mice. The posterior wall thickness (LVPW) in systole and the internal ventricular septum (IVS) in both systole and diastole were significantly increased after ethanol intake indicating a similar cardiac hypertrophy development in both genotypes. However, the left ventricular internal diameter (LVID) in systole was significantly reduced in *Fgf21*^{-/-} mice after chronic alcohol intake compared to their corresponding wt mice. No difference was found in the end systolic and diastolic volumes (ESV and EDV). Finally, the aortic (A) velocity and the E velocity were significantly increased in *Fgf21*^{-/-} mice after ethanol intake compared to their corresponding wt mice, indicating a clear diastolic dysfunction in *Fgf21*^{-/-} mice after chronic ethanol consumption. No differences in blood pressure were observed in any of the groups.

Together, these results indicate that chronic alcohol consumption leads to compensatory cardiac hypertrophy in wt mice whereas in *Fgf21*^{-/-} mice, alcoholism leads to cardiac hypertrophy with diastolic dysfunction.

Cardiac fibrosis is enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice after chronic alcohol consumption

Fibrosis develops in the heart under pathological conditions including alcoholic cardiomyopathy^{27, 28} and our group has previously demonstrated an anti-fibrotic effect of FGF21 in hypertensive heart disease¹⁵. Thus, we next assess fibrosis in hearts from wt and *Fgf21*^{-/-} mice by staining tissue samples for collagen using Trichrome Masson staining and analyzing samples for mRNA expression analysis of transforming growth factor beta (*Tgfβ*) and Collagen 3 (*Col3a1*).

An analysis of hearts by Trichrome Masson staining showed evidences of some fibrosis in alcoholic wt mice, but showed a significant increase in fibrotic areas in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice after chronic alcohol intake (Fig 3C). We also observed a significant increase in the expression levels of *Col3a1* and *Tgfβ*, the master regulator of fibrosis, in the hearts from alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice (Fig 3D). On the basis of these results, we conclude that development of alcoholic cardiomyopathy in *Fgf21*^{-/-} mice is associated with enhanced cardiac fibrosis.

Fgf21 knockdown impairs cardiac metabolism during the development of alcoholic cardiomyopathy

Alcoholic cardiomyopathy is characterized by increased fatty acid uptake in the heart and cardiac lipotoxicity²⁹. To address the impact of Fgf21 knockdown on cardiac metabolic control we examined the expression levels of genes involved in fatty acid and glucose metabolism in the myocardium (Fig 4). First, we analyzed the genes involved in fatty acid transport and we found that the mRNA expression levels of the fatty acid transporter Cd36, and the fatty acid transporter into the mitochondria carnitine palmitoyltransferase (*cpt1b*), were significantly up-regulated in the myocardium of alcoholic mice. Furthermore, the expression levels of the nuclear receptors Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*PPARα*) and Estrogen-related receptor alpha (*ERRα*) controlling fatty acid and mitochondrial oxidation-related genes were significantly decreased only in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice after chronic alcohol intake. Next we analyzed the mRNA levels of genes encoding fatty acid oxidation-related proteins: very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acavdl*), Enoyl-CoA Hydratase and 3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase (*Ehhadh*), Acyl-CoA Oxidase 1 (*Acox-1*), and pyruvate dehydrogenase kinase-4 (*Pdk4*). With the exception of *Pdk4* –the enzyme responsible for the switching between glucose and fatty acid metabolism– which was significantly up-regulated by alcohol consumption in both genotypes, the rest of the

genes involved in fatty acid oxidation were significantly decreased in the myocardium of alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice. Finally, we also analyzed the expression levels of Glut1 (a constitutive glucose transporter) which was down-regulated during alcohol consumption in both genotypes but it was already significantly decreased in control *Fgf21*^{-/-} mice. These data suggest that the hearts of alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice decrease the usage of fatty acids and glucose, potentially compromising cardiac function during alcoholic cardiomyopathy.

Alcoholic cardiomyopathy promotes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Fgf21*^{-/-} mice

Next, we assessed mitochondrial function and oxidative stress in these hearts. Electron microscopic examination of the hearts from mice after chronic alcohol intake revealed that mitochondria showed a markedly abnormal structure in alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice, they were larger in size and showed a relative loss of cristae respect to those in wild-type mice (Fig. 5A). This prompted us to assess the expression and function of mitochondrial genes in these animals. We evaluated the transcript levels for genes encoding proteins related to mitochondrial respiratory capacity and mitochondrial fusion. Transcript and protein levels of optic atrophy 1 (*Opa1*), which is involved in the mitochondrial fusion processes, were significantly decreased in alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 5B). Expression levels of Cytochrome b (*Cytb*) and NADH dehydrogenase subunit 1 (*Nd1*), which are encoded by mitochondrial DNA, and NADH dehydrogenase complex I assembly factor 4 (*Ndufa4*) and Succinate dehydrogenase complex subunit A (*Sdha*) which are encoded by nuclear DNA, were diminished in *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 5C). Finally, we examined whether these alterations may lead to deficiencies in respiratory function by assaying cytochrome c oxidase (COX) activity in the heart. COX activity, indicative of the functional state of electron transport complex IV tends to decrease in alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 5D). Collectively, these results

indicate that alcoholic cardiomyopathy in *Fgf21*^{-/-} mice has an effect on heart mitochondria and leads to reduced expression of fusion genes, decreased expression of mitochondrial and nuclear DNA-encoded genes of the respiratory mitochondrial chain, and a trend to diminish mitochondrial respiratory function.

Next, as an indicator of oxidative damage to lipid membranes we determined lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) formation (Fig. 5E). We found that the levels of MDA tend to increase in alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice although it did not reach statistical significance. The ratio oxidative stress versus complex IV activity as a measurement of oxidative stress production per respiratory mitochondrial cycle has also a tendency to increase in alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice (Fig 5F).

Finally, we determine the mRNA expression levels of genes involved in antioxidant pathways, including uncoupling protein (Ucp)-2, Ucp3, glutathione peroxidase-1 (Gpx1), and catalase (Cat), under basal conditions and in response to alcohol intake, in wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 5G). We found that alcohol consumption did not alter the expression of any of these genes in wt mice. However, in *Fgf21*^{-/-} mice the expression levels of Gpx1 and Ucp2 were significantly increased in *Fgf21*^{-/-} mice compared to their corresponding wt mice. Furthermore, the mRNA expression levels of Ucp3 and Cat were significantly up-regulated in alcoholic versus non-alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice.

Collectively, these data indicate that alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice develop mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the myocardium. In order to compensate oxidative stress-induced cardiac damage the myocardium of alcoholic *Fgf21*^{-/-} mice activates antioxidant defenses.

Oxidative stress is induced in alcoholic patients developing cardiomyopathy and is positively associated to FGF21 protein levels in the myocardium

Finally, we assessed oxidative stress and mitochondrial function in the cardiac samples from heart donor healthy individuals (controls) and alcoholic patients developing or not

cardiomyopathy (Fig. 6). Measurement of lipid peroxidation in these hearts by measuring formation malondialdehyde (MDA) as an indicator of oxidative damage, revealed a significant increase of MDA in alcoholic hearts developing cardiomyopathy compared to healthy hearts (Fig. 6A). Subsequent analysis of mitochondrial complex IV activity indicates a clear trend to be reduced in the myocardium of alcoholic patients with cardiomyopathy (Fig. 6B). The ratio oxidative stress versus complex IV activity was also significantly increased in alcoholic cardiomyopathic hearts (Fig. 6C). Next, we correlate the levels of oxidative stress (MDA levels) with the protein levels of FGF21 in the myocardium of these patients. We found that oxidative stress levels were directly, positively and significantly associated to FGF21 expression (Fig. 6D). Finally, we analysed the protein levels of SOD2 involved in the anti-oxidant defences in the myocardium and we found a significant increase of this protein in patients developing ACM (Fig 6E).

DISCUSSION

Despite several studies on the role of FGF21 in many cardiac diseases, the role of FGF21 during alcoholic cardiomyopathy has not been investigated. Our study shows that circulating FGF21 levels and FGF21 myocardial expression in mice and in humans increase after chronic alcohol consumption. In this context, it has previously been reported that circulating levels of FGF21 are elevated in chronic alcoholic patients²¹ and in experimental models of chronic alcohol intake³⁰. Considering the greater extent of FGF21 expression in the liver relative to other tissues, and experimental evidence that the liver has a main role in producing systemic FGF21^{31, 32}, the liver is likely to account for the alcoholism-related increase in FGF21 levels, in agreement with previous reports^{21, 30}.

In contrast to almost all extra-hepatic tissues, we found that FGF21 expression was induced in the hearts of mice and was gradually induced in alcoholic human hearts developing cardiomyopathy. Although we cannot rule out the possibility that the heart might contribute to circulating levels of FGF21, the relatively low expression of FGF21 in the heart compared with that in the liver¹² makes it unlikely that the alcoholism-related upregulation of systemic FGF21 is primarily of cardiac origin. Moreover, we also show for the first time the presence of β -klotho, the co-receptor required for the biological action of FGF21, in human heart samples from patients developing ACM. Thus, during alcoholic cardiomyopathy, the heart appears to be highly sensitive to and is targeted by FGF21 of systemic and/or local origin. Probably, this FGF21 and β -klotho upregulation during pathological conditions such as ACM acts as a compensatory mechanism of cardioprotection, as previously described in other pathological situations^{33, 34}.

We report here a higher degree of cardiac damage in *Fgf21*^{-/-} mice after chronic ethanol consumption characterized by more fibrosis, hypertrophy and diastolic dysfunction. Although central effects of FGF21 inhibiting alcohol preference in both mice and humans have been reported^{22, 23}, it is unlikely that the higher degree of cardiac damage observed in *Fgf21*^{-/-} mice is due to central regulation because of the ethanol pair fed nature of the experiment.

Alcohol and their metabolites lead to direct cardiac damage impairing mitochondrial function by increasing oxidative stress, decreasing expression of respiratory chain complexes⁸, decreasing membrane potential⁹ and altering mitochondrial DNA¹⁰. The lack of some of these events in our wt mice after chronic alcohol intake is probably due to differences in duration of the treatment and ethanol dose in our experiments²⁹.

In humans, our data shows that cardiac damage is increased by alcohol intake and is associated to FGF21 upregulation in response to mitochondrial dysfunction and oxidative stress. This direct

association between FGF21 protein levels in the myocardium and the degree of hypertrophy, fibrosis and oxidative stress point out FGF21 as a potential biomarker of the prognosis of ACM in humans.

In summary, we herein show that FGF21 targets the heart and protects it against ACM, especially activating the anti-oxidative defenses in the myocardium.

Acknowledgements

This work was supported by SAF2014-55702-JIN and SAF2017-85722-R from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), Generalitat de Catalunya (2014SGR-141), by Fundació la Marató de TV3 201533/30-31 and Sociedad Española de Cardiología (SEC). AP is supported by a [RYC-2014-16572](#) fellowship.

We thank A. Però and M. Morales for technical support.

Author contributions statement

The experiments were conceived and designed by AP, FV and JFS; experiments in animals were performed by GFC; echocardiography was performed by MZ and FC; experiments in humans were performed by MGM, GG and JFS; data were analysed by AP, JFS and FV. The paper was written by AP and JFS.

Conflict of Interest

None declared

BIBLIOGRAPHY

- (1) Guzzo-Merello G, Segovia J, Dominguez F et al. Natural history and prognostic factors in alcoholic cardiomyopathy. *JACC Heart Fail* 2015 January;3(1):78-86.
- (2) Piano MR. Alcoholic cardiomyopathy: incidence, clinical characteristics, and pathophysiology. *Chest* 2002 May;121(5):1638-50.
- (3) Iacovoni A, De MR, Gavazzi A. Alcoholic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2010 December;11(12):884-92.
- (4) Teragaki M, Takeuchi K, Takeda T. Clinical and histologic features of alcohol drinkers with congestive heart failure. *Am Heart J* 1993 March;125(3):808-17.
- (5) Manthey J, Probst C, Rylett M, Rehm J. National, regional and global mortality due to alcoholic cardiomyopathy in 2015. *Heart* 2018 October;104(20):1663-9.
- (6) Ribeiro AL, Otto CM. Heartbeat: The worldwide burden of atrial fibrillation. *Heart* 2018 December;104(24):1987-8.
- (7) Fernandez-Sola J, Planavila PA. New Treatment Strategies for Alcohol-Induced Heart Damage. *Int J Mol Sci* 2016 September 29;17(10):1-22.
- (8) Matyas C, Varga ZV, Mukhopadhyay P et al. Chronic plus binge ethanol feeding induces myocardial oxidative stress, mitochondrial and cardiovascular dysfunction, and steatosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016 June 1;310(11):H1658-H1670.
- (9) Ma H, Yu L, Byra EA et al. Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: role of protein phosphatases. *J Mol Cell Cardiol* 2010 August;49(2):322-9.
- (10) Laurent D, Edwards JG. Alcoholic Cardiomyopathy: Multigenic Changes Underlie Cardiovascular Dysfunction. *J Cardiol Clin Res* 2014 January;2(1).
- (11) Zhang B, Turdi S, Li Q et al. Cardiac overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction but not hypertrophy: Roles of Akt, mTOR, GSK3beta, and PTEN. *Free Radic Biol Med* 2010 October 15;49(7):1238-53.
- (12) Planavila A, Redondo I, Hondares E et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* 2013 June 17;4:2019.
- (13) Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res* 2015 April 1;106(1):19-31.

- (14) Planavila A, Redondo-Angulo I, Villarroya F. FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015;6:133.
- (15) Ferrer-Curriu G, Redondo-Angulo I, Guitart-Mampel M et al. Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease. *J Pathol* 2018 December 23.
- (16) Shen Y, Zhang X, Xu Y et al. Serum FGF21 Is Associated with Future Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *Cardiology* 2018;139(4):212-8.
- (17) Wu F, Wang B, Zhang S et al. FGF21 ameliorates diabetic cardiomyopathy by activating the AMPK-paraoxonase 1 signaling axis in mice. *Clin Sci (Lond)* 2017 August 1;131(15):1877-93.
- (18) Zhang W, Chu S, Ding W, Wang F. Serum Level of Fibroblast Growth Factor 21 Is Independently Associated with Acute Myocardial Infarction. *PLoS One* 2015;10(6):e0129791.
- (19) Zhang X, Hu Y, Zeng H et al. Serum fibroblast growth factor 21 levels is associated with lower extremity atherosclerotic disease in Chinese female diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* 2015 March 11;14:32.
- (20) Soberg S, Andersen ES, Dalsgaard NB et al. FGF21, a liver hormone that inhibits alcohol intake in mice, increases in human circulation after acute alcohol ingestion and sustained binge drinking at Oktoberfest. *Mol Metab* 2018 May;11:96-103.
- (21) Liu Y, Zhao C, Xiao J et al. Fibroblast growth factor 21 deficiency exacerbates chronic alcohol-induced hepatic steatosis and injury. *Sci Rep* 2016 August 8;6:31026.
- (22) Talukdar S, Owen BM, Song P et al. FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab* 2016 February 9;23(2):344-9.
- (23) Schumann G, Liu C, O'Reilly P et al. KLB is associated with alcohol drinking, and its gene product beta-Klotho is necessary for FGF21 regulation of alcohol preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 December 13;113(50):14372-7.
- (24) Soberg S, Sandholt CH, Jespersen NZ et al. FGF21 Is a Sugar-Induced Hormone Associated with Sweet Intake and Preference in Humans. *Cell Metab* 2017 May 2;25(5):1045-53.
- (25) Fernandez-Sola J, Borrissier-Pairo F, Antunez E, Tobias E. Myostatin and insulin-like growth factor-1 in hypertensive heart disease: a prospective study in human heart donors. *J Hypertens* 2015 April;33(4):851-8.
- (26) Li SY, Ren J. Cardiac overexpression of alcohol dehydrogenase exacerbates chronic ethanol ingestion-induced myocardial dysfunction and hypertrophy: role of insulin signaling and ER stress. *J Mol Cell Cardiol* 2008 June;44(6):992-1001.

- (27) Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 2011 January 25;123(3):327-34.
- (28) Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007 March;117(3):568-75.
- (29) Hu C, Ge F, Hyodo E et al. Chronic ethanol consumption increases cardiomyocyte fatty acid uptake and decreases ventricular contractile function in C57BL/6J mice. *J Mol Cell Cardiol* 2013 June;59:30-40.
- (30) Desai BN, Singhal G, Watanabe M et al. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is robustly induced by ethanol and has a protective role in ethanol associated liver injury. *Mol Metab* 2017 November;6(11):1395-406.
- (31) Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010 March 3;11(3):206-12.
- (32) Redondo-Angulo I, Mas-Stachurska A, Sitges M et al. Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy. *Cardiovasc Res* 2017 May 4;13(113):1574-84.
- (33) Ye D, Wang Y, Li H et al. Fibroblast growth factor 21 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1alpha-mediated antioxidant capacity in mice. *Hepatology* 2014 September;60(3):977-89.
- (34) Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JG et al. FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis. *Endocrinology* 2012 June;153(6):2689-700.

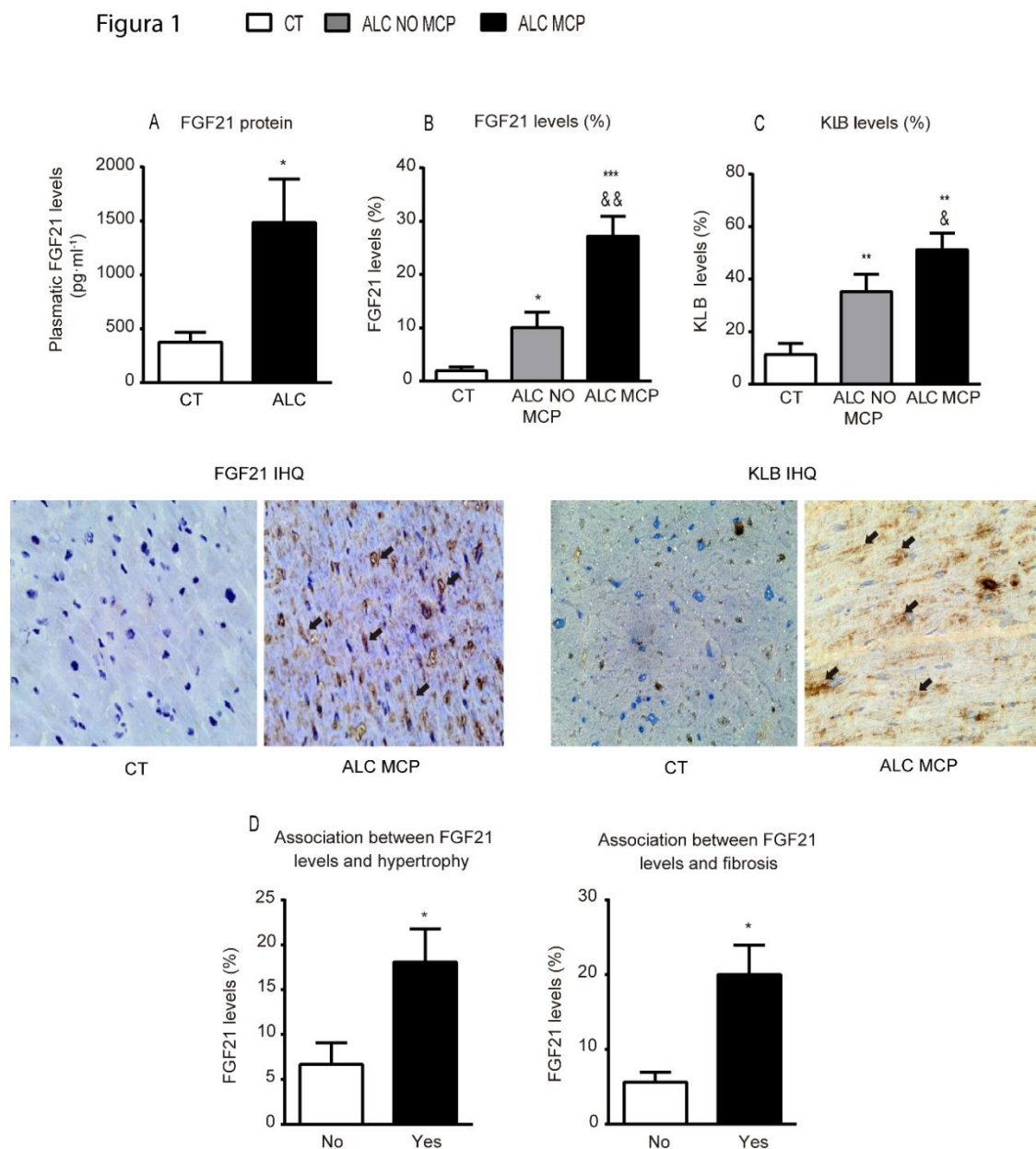


Figure 1. FGF21 and β -klotho are increased in the myocardium of alcoholic patients. (A) FGF21 plasma levels of human controls (CT) and alcoholic patients (ALC). (B) Quantification of protein levels of FGF21 in myocardial samples from control donors (CT), alcoholic patients without CMP (non CMP), and alcoholic patients developing CMP (CMP). Representative images of myocardial samples from human control donor (*left*) and alcoholic donor affected by cardiomyopathy (ALC CMP; *right*), immunostained for FGF21. (C) Quantification of protein levels of β -klotho (KLB) in myocardial samples from control donors (CT), alcoholic patients without CMP (non CMP), and alcoholic patients developing CMP (CMP). Representative images of myocardial samples from human control donor (*left*) and alcoholic donor affected by cardiomyopathy (ALC CMP; *right*), immunostained for KLB. (D) Correlation between FGF21 protein levels and fibrosis (*left*) and hypertrophy (*right*). Results are presented as means \pm SEM (* p <0.05 compared with the control group, & p <0.05 compared with the non-CMP group).

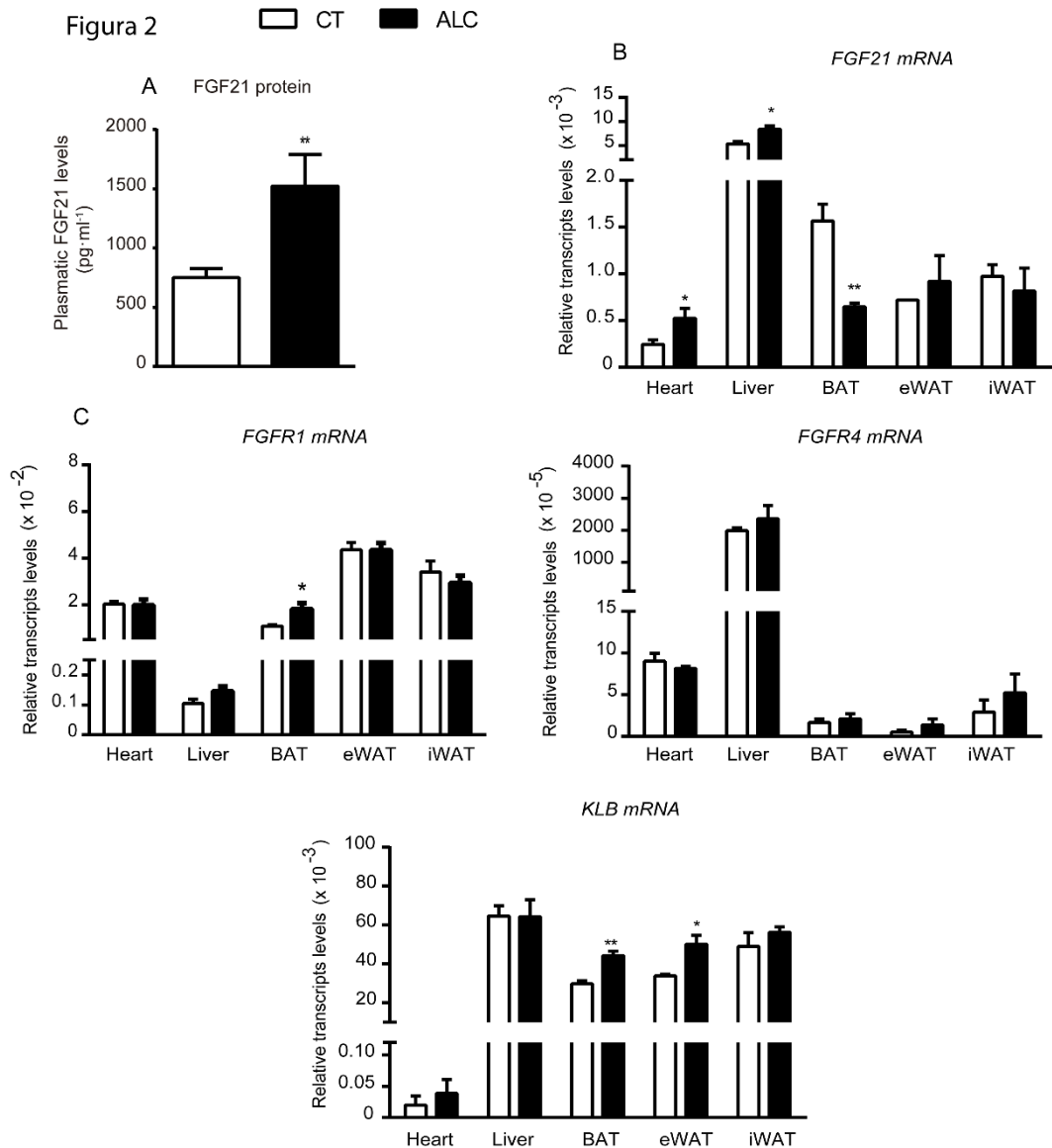


Figure 2. Characterization of the FGF21 system during alcoholic cardiomyopathy in mice. Alcoholic cardiomyopathy was experimentally induced by feeding mice with a liquid diet with 4% (vol/vol) ethanol content for 12 weeks. (A) Plasma levels of FGF21 in control mice (CT) and alcoholic mice (ALC). (B) mRNA expression levels of *Fgf21* in heart, liver, brown adipose tissue (BAT), epididymal and inguinal white adipose tissues (eWAT and iWAT) in control and alcoholic wt mice. (C) mRNA expression levels of the co-receptor β -klotho (*Klb*) and the FGF21 receptors *Fgfr1* and *Fgfr4* in heart, liver, BAT, eWAT and iWAT in control and alcoholic wt mice. Results are presented as means \pm SEM (n=5 mice/group; *p<0.05 compared with the corresponding CT mice).

Figura 3 CT ALC

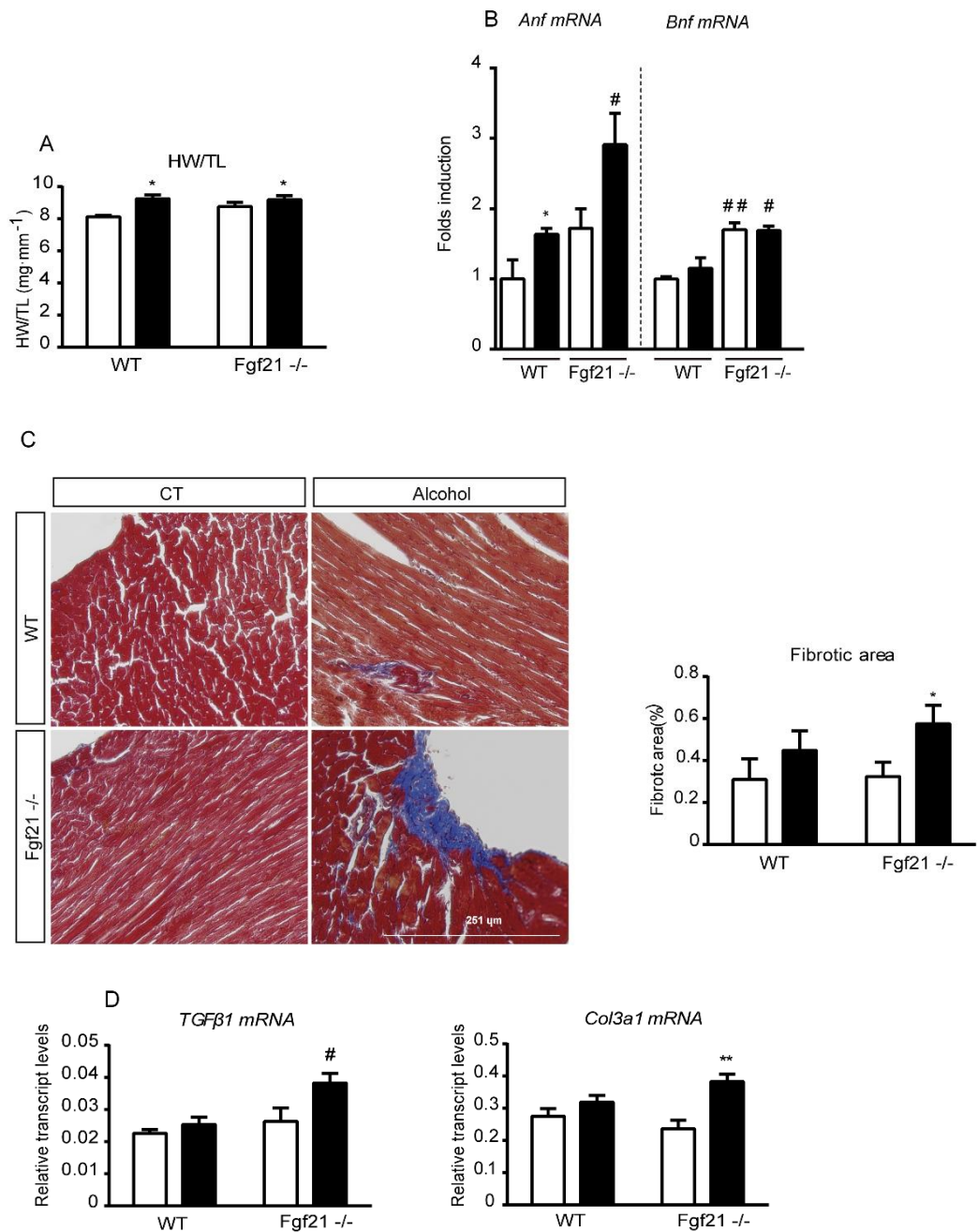


Figure 3. Mice lacking FGF21 develop cardiac hypertrophy and fibrosis after chronic alcohol intake. Alcoholic cardiomyopathy was experimentally induced by feeding adult wt and *Fgf21*^{-/-} mice with a liquid diet with 4% (vol/vol) ethanol content for 12 weeks (ALC); control mice (CT) were fed with the same liquid diet without alcohol. (A) Heart weight (mg) to tibia length (mm) ratio in CT and ALC-treated wt and *Fgf21*^{-/-} mice. (B) mRNA expression levels of the hypertrophy markers *Anf* and *Bnf*. (C) Representative images showing Trichrome Masson Staining (*left*) and quantification of left ventricular fibrotic areas, shown as positively-stained areas divided by total area of the heart section (*right*). Scale bar: 251 μ M. (D) mRNA expression levels of the fibrotic markers *Col3a1* and *Tgfβ1*. Results are presented as means \pm SEM (n=5 mice/group; *p<0.05 compared with the corresponding CT mice, and #p<0.05 compared with the corresponding wt mice).

Figura 4

□ CT ■ ALC

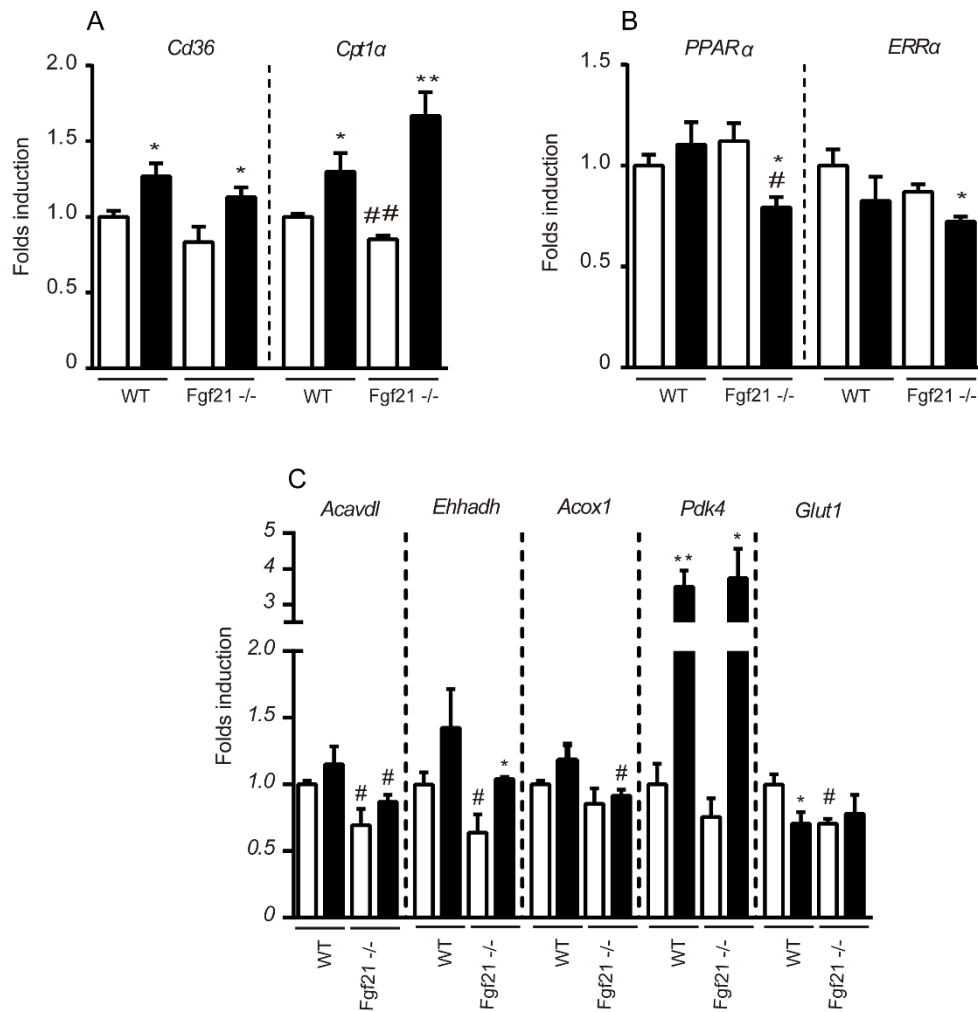


Figure 4. Cardiac metabolism is impaired in *Fgf21*^{-/-} mice after chronic alcohol consumption. Alcoholic cardiomyopathy was experimentally induced by feeding adult wt and *Fgf21*^{-/-} mice with a liquid diet with 4% (vol/vol) ethanol content for 12 weeks (ALC); control mice (CT) were fed with the same liquid diet without alcohol. (A) Expression levels of genes involved in fatty acid transport, the fatty acid transporter *Cd36*, and the fatty acid transporter into the mitochondria carnitine palmitoyltransferase (*Cpt1b*). (B) mRNA expression levels of the nuclear receptors Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*Ppara*) and Estrogen-related receptor alpha (*Errα*). (C) Expression levels of genes involved in fatty acid oxidation: very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acavdl*), Enoyl-CoA Hydratase and 3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase (*Ehhadh*), Acyl-CoA Oxidase 1 (*Acox1*), and pyruvate dehydrogenase kinase-4 (*Pdk4*), and the glucose transporter *Glut1*. Results are presented as means ± SEM (n=5 mice/group; *p<0.05 compared with the corresponding CT mice, and #p<0.05 compared with the corresponding wt mice).

Figura 5

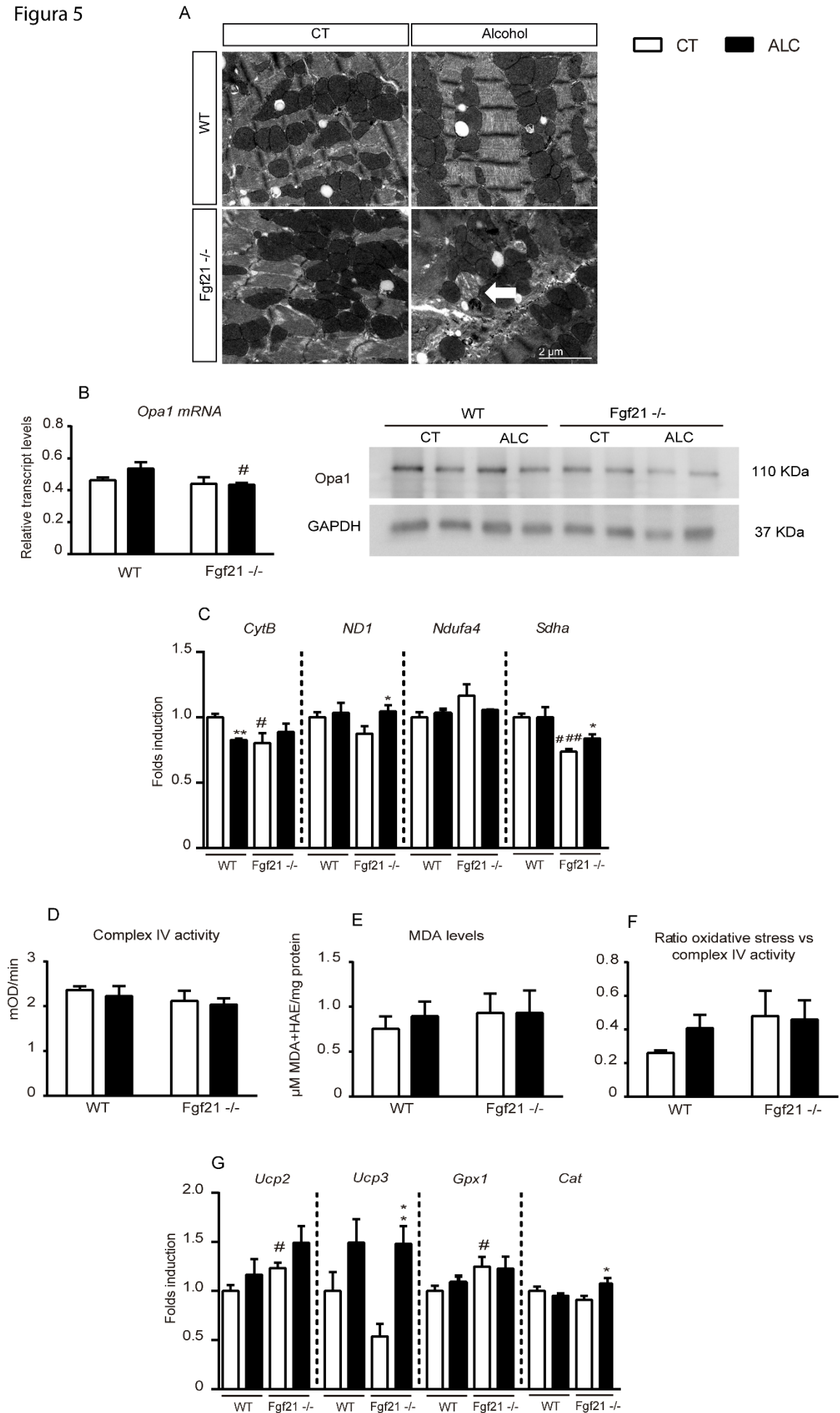


Figure 5. *Fgf21*^{-/-} mice develop mitochondrial dysfunction and oxidative stress after chronic alcohol consumption. Alcoholic cardiomyopathy was experimentally induced by feeding adult wt and *Fgf21*^{-/-} mice with a liquid diet with 4% (vol/vol) ethanol content for 12 weeks (ALC); control mice (CT) were fed with the same liquid diet without alcohol. (A) Electron microscopy images from hearts showing mitochondrial enlargement and loss of cristae in *Fgf21*^{-/-} mice developing alcoholic cardiomyopathy. (B) Expression levels of *Opa1* and protein levels of Opa1 assessed by immunoblotting. An anti-GAPDH antibody was used as loading control. (C) Expression levels of Cytochrome b (*Cytb*), NADH dehydrogenase subunit 1 (*Nd1*), NADH dehydrogenase complex I assembly factor 4 (*Ndufa4*), and Succinate dehydrogenase complex subunit A (*Sdha*). (D) Determination of mitochondrial cytochrome c oxidase complex IV (CoxIV) activity in hearts. (E) Measurement of malondialdehyde (MDA) levels in the myocardium. (F) Ratio between oxidative stress (MDA levels) and complex IV activity. (G) mRNA expression levels of genes involved in antioxidant pathways, uncoupling protein (*Ucp2*), *Ucp3*, glutathione peroxidase-1 (*Gpx1*), and catalase (*Cat*). Data are presented as means \pm SEMs (* $p < 0.05$ compared with wild-type animals, and # $p < 0.05$ compared with the corresponding wt mice).

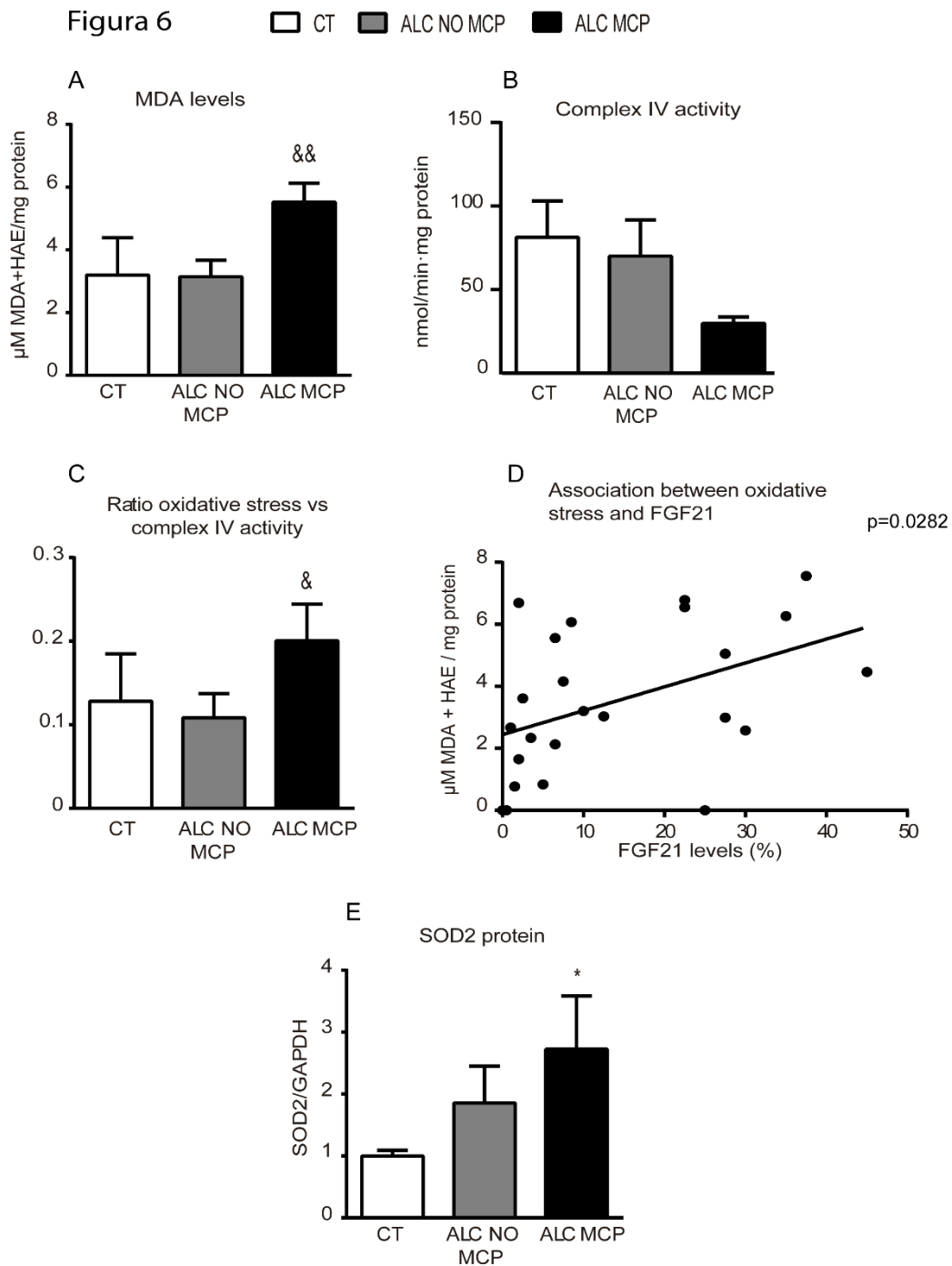


Figure 6. Oxidative stress and mitochondrial function in the myocardium of human donors. Myocardial samples from control donors (CT), alcoholic patients without CMP (non CMP), and alcoholic patients developing CMP (CMP) were analyzed. (A) Measurement of malondialdehyde (MDA) levels. (B) Determination of mitochondrial cytochrome c oxidase complex IV (CoxIV) activity in hearts. (C) Ratio between oxidative stress (MDA levels) and complex IV activity. (D) Correlation between MDA levels and FGF21 protein levels in the myocardium. (E) Protein levels of SOD2 in the heart. Results are presented as means \pm SEM (* $p < 0.05$ compared with the control group, & $p < 0.05$ compared with the non-CMP group).

Table 1. Echocardiographic data of wt and *Fgf21*^{-/-} mice

	WT Control	WT Alcohol	FGF21 -/- Control	FGF21 -/- Alcohol	P-value
LVPWs (mm)	0,93 ± 0,02	1,07 ± 0,05	0,93 ± 0,02	1 ± 0,02	#
LVPWd (mm)	0,67 ± 0,02	0,77 ± 0,034	0,7 ± 0,04	0,73 ± 0,05	
LVIDs (mm)	2,82 ± 0,15	3,24 ± 0,11	3,4 ± 0,11	3,1 ± 0,21	&
LVIDd (mm)	4,05 ± 0,15	4,3 ± 0,09	4,4 ± 0,11	4,16 ± 0,25	
IVSd (mm)	0,68 ± 0,022	0,93 ± 0,07	0,7 ± 0,03	0,93 ± 0,04	#
IVSs (mm)	1,24 ± 0,04	1,38 ± 0,03	1,14 ± 0,05	1,35 ± 0,04	#
Aortic velocity (m/s)	1,028 ± 0,03	1,13 ± 0,01	1,144 ± 0,02	1,24 ± 0,04	* #
VTI (cm)	5,28 ± 0,67	6,2 ± 0,62	6,02 ± 0,44	6,6 ± 0,65	
E velocity (m/s)	0,75 ± 0,037	0,66 ± 0,033	0,62 ± 0,026	0,73 ± 0,04	&
Mitral deceleration (ms)	36,5 ± 2,5	35,5 ± 1,56	35,5 ± 1,8	37 ± 3,8	
EF (%)	65 ± 2,07	59 ± 3,6	54,2 ± 2,41	56,5 ± 0,74	*
FS (%)	31 ± 1,37	27,25 ± 2,28	24 ± 1,48	25,5 ± 0,22	*
Heart Rate (bpm)	315,5 ± 4,84	375,3 ± 18,53 *	341 ± 17,59	367,5 ± 8,27	#
EDV (mm ³)	73,12 ± 6,43	83,7 ± 4,25	89,4 ± 5,19	86,59 ± 11,45	
ESV (mm ³)	30,92 ± 4,04	42,8 ± 3,82	48,15 ± 3,85	43,86 ± 6,11	
Sistolic Pressure (mmHg)	109,4 ± 5,9	105,4 ± 2,5	104,8 ± 2,5	97,9 ± 2,5	
Diastolic Pressure (mmHg)	58,1 ± 4,1	64,3 ± 5,1	54,6 ± 2,1	53,8 ± 4.7	

Supplementary material:

Table S1: Clinical data of patients

Parameters	Control N = 11	Alcoholics		P value
		No MCP N = 17	MCP N = 12	
Age (years)	58.50±4.07	51.33±2.01	53.09±3.95	NS
Ethanol intake (years)	18.10±4.05	21.94±3.50	17.00±4.84	NS
Gender	75% female 25% male	24% female 76% male	8% female 92% male	Fisher
Hypertrophy	9% yes 91% no	80% yes 20% no	83% yes 17% no	Fisher
Fibrosis	22% yes 78% no	60% yes 40% no	75% yes 25% no	Fisher

Values are presented as mean ± standard error of the mean. Case-control differences were sought by non-parametric statistical analysis.

Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery

Revista: International Journal of Obesity

PMID: 29081506

Resum:

La cirurgia bariàtrica és la teràpia més efectiva per a la diabetis tipus 2. Tot i això, els principals mecanismes responsables dels seus efectes beneficiosos segueixen sense concretar-se. En aquest estudi, analitzem els efectes de la cirurgia bariàtrica en els nivells circulants de Meteorin like (Metrnl) i d'oncastatina m (OSM), dos hormones relacionades amb la homeòstasi energètica. Els nivells circulants de Metrnl i OSM es van mesurar a nivell basal, 6 i 12 mesos després de la gastrectomia laparoscòpica de màniga (LSG) en 25 pacients amb obesitat i en 33 persones control amb normopès. A nivell basal, els pacients amb obesitat mostren una disminució en els nivells circulants de Metrnl i un augment en els nivells de OSM en comparació amb els controls. La LSG augmenta els nivells de Metrnl i disminueix els de OSM, i aquests correlacionen amb millores en la homeòstasi de la glucosa i dels lípids. Les nostres dades indiquen que la LSG modula inversament els nivells de Metrnl i OSM, i suggereix que un doble plantejament modulant aquestes dues molècules pot proporcionar una nova estratègia pel tractament de l'obesitat i la diabetis tipus 2.

SHORT COMMUNICATION

Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery

S Pellitero^{1,7}, I Piquer-Garcia^{1,7}, G Ferrer-Curriu^{2,3,7}, R Puig¹, E Martínez¹, P Moreno⁴, J Tarascó⁴, J Balibrea⁵, C Lerin⁶, M Puig-Domingo¹, F Villarroya^{2,3}, A Planavila^{2,3} and D Sánchez-Infantes¹

Bariatric surgery is currently the most effective therapy for type 2 diabetes. However, the mechanisms underlying its beneficial effects remain elusive. Here we studied the effects of bariatric surgery on circulating meteorin-like (Metrl) and oncostatin m (OSM) levels, two hormones intimately linked to energy homeostasis. Metrl and OSM levels were assessed at baseline, 6 and 12 months after laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) in 25 patients with obesity, as well as in 33 normal-weight controls. At baseline, patients with obesity showed lower Metrl and higher OSM levels compared to controls. LSG increased Metrl and decreased OSM levels, in correlation to improvements in glucose and lipid homeostasis. Our data indicate that LSG conversely modulated Metrl and OSM levels, and suggest that a dual approach modulating these two molecules might provide a novel strategy for obesity and type 2 diabetes treatment.

International Journal of Obesity (2018) 42, 919–922; doi:10.1038/ijo.2017.268

INTRODUCTION

Bariatric surgery is currently the most effective therapy for type 2 diabetes.^{1–4} A main benefit of bariatric surgery is activation of brown adipose tissue (BAT) and browning of white adipose tissue (WAT), leading to increased energy expenditure, weight loss and an overall improvement in systemic glucose and lipid metabolism.^{5,6} However, the mechanisms contributing to these beneficial effects are poorly understood.

Meteorin-like (Metrl) and oncostatin m (OSM) are two hormones intimately linked to BAT activity and WAT browning.^{7,8} Metrl, a protein secreted in response to exercise and cold exposure by skeletal muscle and WAT, promotes WAT browning, increasing energy expenditure and improving glucose tolerance.⁷ OSM, a pro-inflammatory gp130 cytokine highly expressed in obesity and type 2 diabetes,⁹ impairs BAT activity and lessens WAT browning.⁸ Here we show that levels of these two molecules are conversely modulated in response to laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG), resulting in a browning-prone environment that can potentially contribute to improved metabolic status.

MATERIALS AND METHODS

Study design

The primary end point was to study the modulation of Metrl and OSM in a retrospective cohort of patients with obesity before and after bariatric surgery. The Institutional Ethics Committee, in accordance with the Declaration of Helsinki, approved the study

(CP15/00106 and EO-12-048). All participants signed the written informed consent before collecting clinical data. Twenty-five patients with morbid obesity (8 male and 17 female) were selected to evaluate circulating levels of Metrl and OSM according to several criteria, including having serum samples at basal, 6 and 12 months post surgery and having been operated with the same type of bariatric surgery (LSG). Hormone levels were determined after a 12 h fast at baseline, and at 6 and 12 months after LSG. LSG removed more than 70% of patient's stomach volume by transecting along the greater curvature from 5 cm proximal to the pylorus up to the His' angle, using a 36 Fr bougie as a calibrator. The rest of the gastrointestinal tract was left intact, with nutrients following the normal route. All patients were clinically evaluated at all time points following the institutional protocol for bariatric surgery. Thirty-three normal-weight healthy subjects (28 male and 5 female) were included as controls. Demographic and clinical data, including age, history of diabetes, hypertension, chronic obstructive apnea and medication were prospectively recorded (Table 1).

Measurements

Endocrine-metabolic parameters were analyzed at the Hospital's certified core laboratory. Metrl levels were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) that was previously used by other researchers,¹⁰ and OSM levels with MILLIPLEX MAP Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 1 (Luminex 200, Millipore Corporation, Burlington, MA, USA).

¹Department of Endocrinology and Nutrition, Germans Trias i Pujol Research Institute, Barcelona, Spain and CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain; ²Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain; ⁴Department of Surgery, Germans Trias i Pujol Research Institute, Barcelona, Spain; ⁵Metabolic and Bariatric Surgery Unit, EAC-BS Center of Excellence, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain and ⁶Endocrinology Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr D Sánchez-Infantes, Department of Endocrinology and Nutrition, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n, Barcelona 08916, Spain or Dr A Planavila, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona 08028, Spain
E-mail: dsanchez@igtp.cat or aplanavila@ub.edu

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 20 July 2017; revised 27 September 2017; accepted 17 October 2017; accepted article preview online 30 October 2017; advance online publication, 5 December 2017

Table 1. Clinical and anthropometric parameters from 33 lean control subjects and 25 patients with obesity before and 6 and 12 months after laparoscopy sleeve gastrectomy

	Lean (n = 33)	Obese (n = 25) ^a		
		Basal	6 months	12 months
Age (years)	45 ± 9	49 ± 9		
BMI (kg m ⁻²)	22.6 ± 2.7 ^{b,c,d}	42.3 ± 6.2 ^a	31.9 ± 1.1 ^b	30.6 ± 1.2 ^b
Glucose (mg dl ⁻¹)	87 ± 7 ^b	111 ± 28 ^a	90 ± 16 ^b	90 ± 14 ^b
Insulin (mIU l ⁻¹)	6.0 ± 3.8 ^{b,c,d}	27.9 ± 20.1 ^a	8.6 ± 4.8 ^b	7.3 ± 3.6 ^b
HbA1c (%)	5.25 ± 0.22 ^{b,c}	6.07 ± 0.76 ^a	5.54 ± 0.69 ^b	5.25 ± 0.28 ^c
HOMA-IR	1.31 ± 1.00 ^{b,c}	6.85 ± 4.65 ^a	2.01 ± 1.26 ^b	1.64 ± 0.81 ^b
TAG (mg dl ⁻¹)	69 ± 40 ^{b,c}	137 ± 68 ^a	97 ± 33 ^b	84 ± 37 ^b
Total Cho (mg dl ⁻¹)	191 ± 34	177 ± 38	184 ± 35	178 ± 46
HDL-Cho (mg dl ⁻¹)	69 ± 18 ^{b,c}	45 ± 11 ^a	51 ± 10 ^{a,b}	64 ± 18 ^b
LDL-Cho (mg dl ⁻¹)	116 ± 35	109 ± 35	114 ± 33	94 ± 28
TNF-α (Log pg ml ⁻¹)	—	1.49 ± 0.22 ^a	1.46 ± 0.16 ^a	1.40 ± 0.19 ^b
IL-6 (Log pg ml ⁻¹)	—	1.11 ± 0.48	1.23 ± 0.30	1.07 ± 0.44
CRP (Log mg l ⁻¹)	-0.48 ± 0.49 ^{b,c,d}	0.58 ± 0.74 ^a	0.23 ± 0.56 ^a	-0.23 ± 0.47 ^b

Abbreviations: BMI, body mass index; Cho, cholesterol; CRP, C-reactive protein; HbA1c, hemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostatic model assessment-insulin resistance; IL-6, interleukin-6; LDL, low-density lipoprotein; TAG, triglycerides; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha. Data are mean ± s.d. Two-tailed Student's *t*-test was applied to determine statistical significance between patients with obesity and lean group. ^aFrom 25 patients participating in this study, 14 presented type 2 diabetes, 14 presented hypertension and 10 presented chronic obstructive apnea. At 12 months, not a single patient received insulin, and only 2 received metformin. ^bStatistical differences between lean and obese group at basal. ^cDifferences between lean and obese group at 6 months. ^dDifferences between lean and obese group at 12 months. One-way analysis of variance with repeated measurements with Tukey's *post hoc* test was applied to analyze data from patients with obesity at basal, 6 and 12 months; different letters mean statistical significance between groups. *P* < 0.05 was considered significant for all analyses.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, data are presented as mean ± s.d. MetrnI and OSM data were log-transformed and multivariate linear regression analysis adjusting for age, sex, basal BMI and type 2 diabetes status implemented in R 3.3.2 (2016, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Two-tailed Student's *t*-test was applied for group comparison of clinical variables. Where three or more groups were present, one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements and Tukey's *post hoc* test were used to determine statistical significance. *P* < 0.05 was considered significant for all analyses.

RESULTS

Clinical and anthropometric parameters of the 25 patients with obesity and 33 controls are shown in Table 1. MetrnI levels were lower in patients with obesity compared to normal-weight subjects, and significantly increased 12 months after LSG (one-way ANOVA *P* < 0.012), although still below levels in normal-weight subjects (Figure 1a). Circulating OSM levels were decreased 12 months after surgery (one-way ANOVA *P* = 0.043; Figure 1a). Undetectable levels of this protein were found in normal-weight individuals. No gender dimorphism was observed in levels of these two molecules, and no differences were found between normoglycemic patients with obesity compared to those with type 2 diabetes (data not shown). Notably, surgery-induced changes in MetrnI and OSM levels were inversely correlated to each other (*r* = -0.51, *P* = 0.009, Figure 1b). Adjustment for pre-surgery BMI, age, sex and type 2 diabetes status did not substantially modify the unadjusted estimates (β_{std} = -0.53, *P* = 0.013, Supplementary Tables S1 and S2). At 12 months, MetrnI levels were inversely correlated to glucose homeostasis variables, including HbA1c, insulin levels and homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR; Figure 1c and Supplementary Table S1 for covariate adjusted estimates). The increase of MetrnI was associated with lower HOMA-IR values evaluated at 12 months after LSG (Supplementary Table S1). Furthermore, the decrease in OSM was directly associated

with improvements in lipid metabolism, including changes in low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels (Figure 1d; Supplementary Table S2). Finally, the decrease in OSM was also associated with lower LDL-cholesterol levels, triglycerides levels and insulin levels evaluated at 12 months after LSG (Figure 1d; Supplementary Table S2), although adjustment for pre-surgery BMI, age, sex and type 2 diabetes status slightly weakened some of the correlations. The decrease in other pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) alpha, interleukin-6 or C-reactive protein was not associated with improvements in lipid metabolism (Supplementary Figure S1).

CONCLUSIONS

Here we report for the first time that bariatric surgery modulates both MetrnI and OSM levels in patients with obesity. Furthermore, we show that changes in levels of both molecules were inversely correlated to each other, strongly suggesting an orchestrated regulation of these two hormones after LSG. Notably, surgery-induced changes in MetrnI and OSM were associated with improvements in glucose homeostasis. The increase in MetrnI after LSG was directly correlated to increased insulin sensitivity (assessed by HOMA-IR), which is consistent with the study from Li *et al.*¹⁰ reporting an insulin-sensitizing effect of MetrnI in mice. Moreover, although surgery decreased levels of several inflammatory cytokines (TNF alpha, interleukin-6 and C-reactive protein), only OSM significantly correlated to ameliorated lipid metabolism. Specifically, the decrease in circulating OSM levels was associated with improvements in fasting insulin levels, as well as in LDL and triglyceride levels. These results support the notion that reduced OSM levels have beneficial effects on metabolism. Indeed, OSM antagonism has been proposed as a strategy to improve type 2 diabetes state, restoring bone marrow function.¹¹ Moreover, OSM blockade was also efficient in improving inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease.¹² Higher MetrnI and lower OSM levels are strongly linked to improved BAT activity, WAT browning and increased energy expenditure.^{7,8} Thus, we can

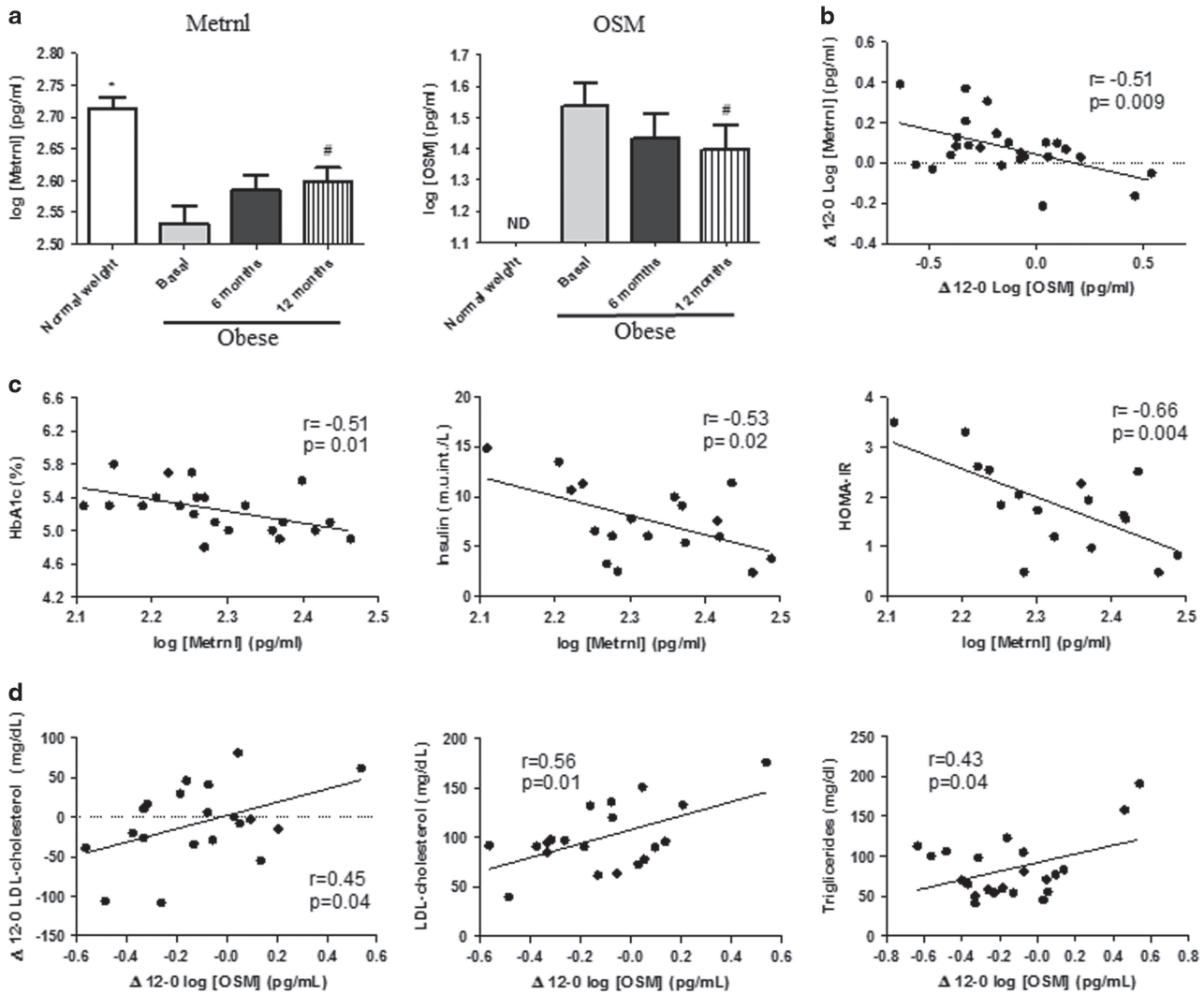


Figure 1. Circulating MetrnI and OSM levels in patients with obesity are modulated after LSG. **(a)** Circulating levels of MetrnI and OSM in normal-weight individuals ($n=33$, white bars) and in patients with obesity ($n=25$) at baseline (gray bars) and 6 (black bars) and 12 months (striped bars) after LSG. Data represent mean \pm s.e.m. *, Two-tailed Student's t -test $P < 0.0001$ normal-weight subjects versus basal group. #, One-way ANOVA with repeated measurements and Tukey's *post hoc* test $P < 0.05$ versus basal group. **(b)** Delta values of these molecules showed a strong inverse correlation ($r = -0.51$; $P = 0.009$). **(c)** MetrnI levels at 12 months correlated inversely with HbA1C, insulin levels and HOMA-IR. **(d)** Surgery-induced changes in OSM levels correlated directly with changes in LDL-cholesterol, and with LDL-cholesterol levels and triglycerides levels evaluated at 12 months after LSG.

speculate that surgery-induced modulation of these two molecules might favor a browning-prone state in patients with obesity, potentially contributing to improvements in energy homeostasis and metabolic health.

Together, our data demonstrate an orchestrated modulation of MetrnI and OSM after LSG, and suggest a potential mechanistic role for these two molecules in the beneficial effects of LSG. As this modulation was not correlated to BMI changes, and previous studies have reported that metabolic improvements after bariatric surgery are produced before a significant body weight reduction (reviewed in Cummings and Cohen⁴), other mechanisms besides conventional weight loss should be after these results. All patients in this study were subjected to LSG, a technique without a malabsorptive component. Determining whether modulation of MetrnI and OSM also occur after other types of bariatric surgery will be subject of future studies. Further studies are warranted to determine whether a dual approach modulating MetrnI and OSM might provide a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Samples from patients included in this study were provided by the IGTP HUGTP Biobank integrated in the Spanish National Biobanks Network of Instituto de Salud Carlos III (PT13/0010/0009) and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. DS-I is an Investigator of the Miguel Servet Fund from Carlos III National Institute of Health, Spain. AP is a Ramón y Cajal researcher. This study was supported by Instituto de Salud Carlos III, and by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Madrid, Spain (CP15/00106), and by SAF2014-55702-JIN from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF).

REFERENCES

- 1 Aron-Wisniewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A *et al*. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 4619–4623.

- 2 Pontiroli AE, Morabito A. Long-term prevention of mortality in morbid obesity through bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis of trials performed with gastric banding and gastric bypass. *Ann Surg* 2011; **253**: 484–487.
- 3 Poitou C, Perret C, Mathieu F, Truong V, Blum Y, Durand H *et al*. Bariatric surgery induces disruption in inflammatory signaling pathways mediated by immune cells in adipose tissue: a RNA-Seq study. *PLoS One* 2015; **10**: e0125718.
- 4 Cummings DE, Cohen RV. Bariatric/metabolic surgery to treat type 2 diabetes in patients with a BMI < 35 kg/m². *Diabetes Care* 2016; **39**: 924–933.
- 5 Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P *et al*. Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; **97**: E1229–E1233.
- 6 Rachid B, van de Sande-Lee S, Rodovalho S, Folli F, Beltrami GC, Morari J *et al*. Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity. *Int J Obes (Lond)* 2015; **39**: 1515–1522.
- 7 Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I *et al*. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 2014; **5**: 1279–1291.
- 8 Sánchez-Infantes D, Cereijo R, Peyrou M, Piquer-García I, Stephens JM, Villarroya F. Oncostatin m impairs brown adipose tissue thermogenic function and the browning of subcutaneous white adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 2017; **25**: 85–93.
- 9 Sanchez-Infantes D, White UA, Elks CM, Morrison RF, Gimble JM, Considine RV *et al*. Oncostatin m is produced in adipose tissue and is regulated in conditions of obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; **99**: E217–E225.
- 10 Li ZY, Song J, Zheng SL, Fan MB, Guan YF, Qu Y *et al*. Adipocyte Metrnl antagonizes insulin resistance through PPAR γ signaling. *Diabetes* 2015; **64**: 4011–4022.
- 11 Albiero M, Poncina N, Ciciliot S, Cappellari R, Menegazzo L, Ferraro F *et al*. Bone marrow macrophages contribute to diabetic stem cell mobilopathy by producing oncostatin M. *Diabetes* 2015; **64**: 2957–2968.
- 12 West NR, Hegazy AN, Owens BM, Bullers SJ, Linggi B, Buonocore S *et al*. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Nat Med* 2017; **23**: 579–589.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

Supplemental Table S1: Correlations of Metrnl circulating levels with clinical variables.

Metrnl	Absolute values at 12 months					Δ values to Δ values					Δ values to 12 months				
		Unadjusted		Adjusted ^a			Unadjusted		Adjusted ^a			Unadjusted		Adjusted ^a	
Variables	n	r	p val	β std	p val	n	r	p val	β std	p val	n	r	p val	β std	p val
BMI (kg/m ²)	25	-0.04	0.845	-0.13	0.468	25	0.00	0.989	0.05	0.783	25	0.02	0.911	-0.04	0.783
HbA1c [#] (%)	22	-0.51	0.015	-0.50	0.039	22	-0.15	0.515	0.09	0.653	22	-0.07	0.769	-0.17	0.422
Insulin (mU/l)	18	-0.53	0.024	-0.70	0.019	12	-0.22	0.493	-0.06	0.895	18	0.24	0.328	0.22	0.459
HOMA-IR ^{##}	17	-0.66	0.004	-0.83	0.003	12	-0.40	0.913	0.03	0.955	17	0.50	0.040	0.55	0.096
TAG (mg/dl)	23	-0.12	0.577	-0.29	0.251	22	-0.08	0.721	-0.13	0.606	23	0.38	0.070	0.39	0.061
LDL-cho (mg/dl)	20	0.33	0.150	0.40	0.144	20	-0.10	0.957	-0.03	0.909	20	0.07	0.785	0.00	0.992
HDL-cho (mg/dl)	24	0.22	0.297	-0.09	0.690	23	-0.01	0.971	-0.06	0.765	24	0.00	0.991	0.03	0.871
OSM (pg/ml)	25	0.01	0.975	0.27	0.297	25	-0.51	0.009	-0.53	0.013	25	0.37	0.067	0.39	0.059

This table shows the unadjusted and adjusted correlations between:

- Metrnl at 12 months vs metabolic variables at 12 months.
- Delta 12-0 Metrnl vs delta 12-0 metabolic variables.
- Delta 12-0 Metrnl vs metabolic variables at 12 months.

^aModel adjusted for age, sex, basal BMI, and type 2 diabetes status.

β std, standardized beta coefficient from statistical model.

[#] Hemoglobin A1c

^{##} homeostatic model assessment-insulin resistance

Supplemental Table S2: Correlations of OSM circulating levels with clinical variables.

OSM Variables	Absolute values at 12 months					Δ values to Δ values					Δ values to 12 months				
	n	Unadjusted		Adjusted ^a		n	Unadjusted		Adjusted ^a		n	Unadjusted		Adjusted ^a	
		r	p val	βstd	p val		r	p val	βstd	p val		r	p val	βstd	p val
BMI (kg/m ²)	25	-0.13	0.539	-0.08	0.601	25	0.08	0.690	0.00	0.999	25	0.02	0.935	0.00	0.999
HbA1c [#] (%)	22	0.02	0.942	-0.08	0.738	22	-0.31	0.165	-0.15	0.459	22	0.07	0.772	0.19	0.419
Insulin (mU/l)	18	0.00	0.995	0.00	0.990	12	0.10	0.758	0.06	0.889	18	-0.50	0.033	-0.52	0.068
HOMA-IR ^{##}	17	0.04	0.873	-0.01	0.964	12	0.03	0.932	0.10	0.836	17	-0.47	0.059	-0.44	0.141
TAG (mg/dl)	23	0.11	0.612	0.14	0.547	22	-0.16	0.485	-0.16	0.508	23	0.43	0.041	-0.37	0.077
LDL-cho (mg/dl)	20	0.41	0.070	0.58	0.054	20	0.45	0.048	0.56	0.021	20	-0.56	0.010	-0.58	0.017
HDL-cho (mg/dl)	24	-0.48	0.018	-0.28	0.161	23	-0.30	0.162	-0.28	0.135	24	0.33	0.119	0.30	0.107
Metrnl (pg/ml)	25	0.01	0.975	0.21	0.297	25	-0.51	0.009	-0.53	0.013	25	-0.07	0.740	-0.05	0.790

This table shows the unadjusted and adjusted correlations between:

- OSM at 12 months vs metabolic variables at 12 months.

- Delta 12-0 OSM vs delta 12-0 metabolic variables.

- Delta 12-0 OSM vs metabolic variables at 12 months.

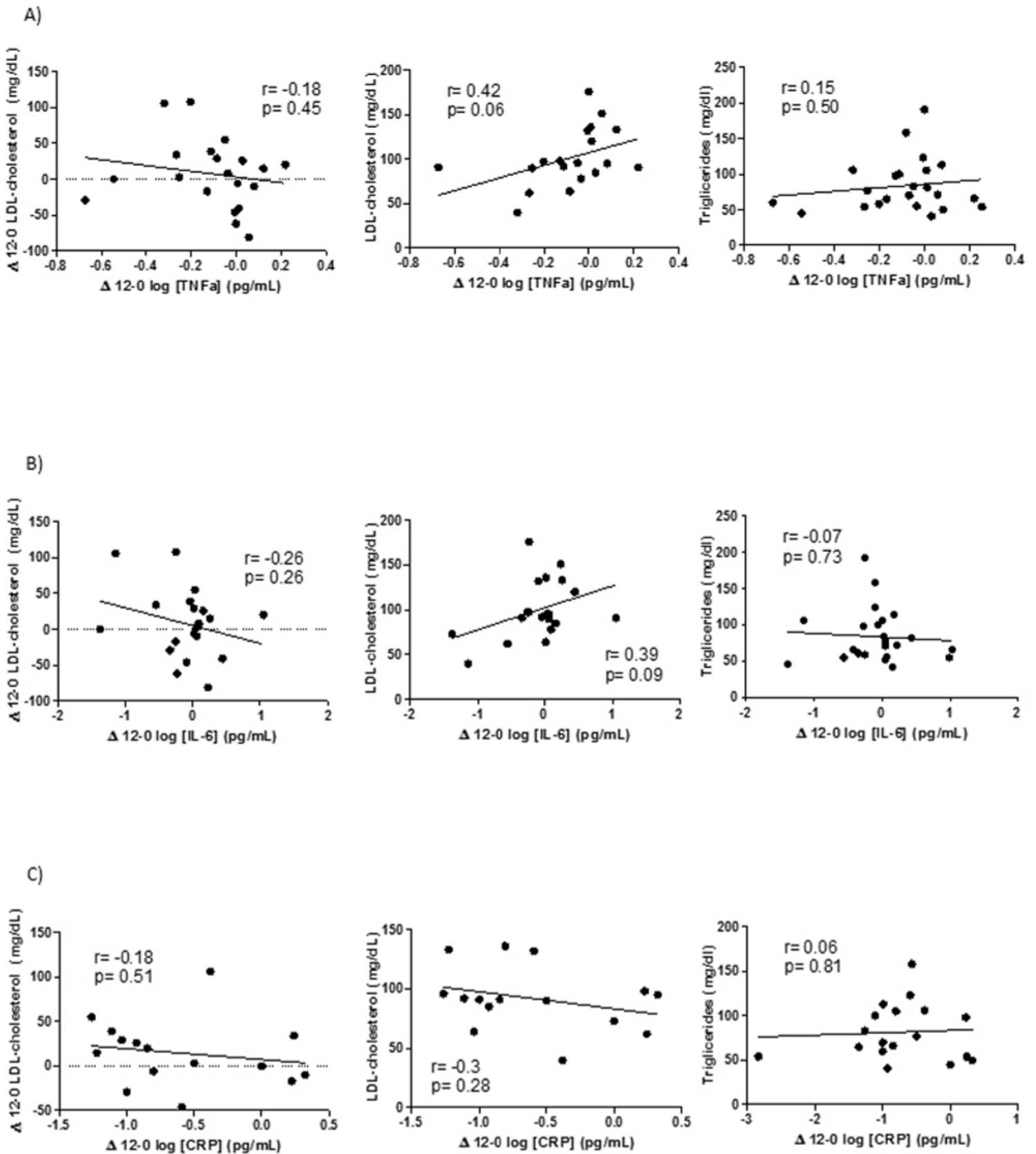
^aModel adjusted for age, sex, basal BMI, and type 2 diabetes status.

βstd, standardized beta coefficient from statistical model.

[#]Hemoglobin A1c

^{##} homeostatic model assessment-insulin resistance

Supplemental Figure S1



Supplemental Figure S1. The decrease in TNF alpha, Interleukin-6 and C-reactive protein is not associated with lipid parameters. **A)** Surgery-induced changes in TNF alpha levels did not correlate with changes in LDL-cholesterol, and with LDL-cholesterol and triglycerides levels evaluated at 12 months after LSG. **B)** Surgery-induced changes in interleukin-6 levels did not correlate with changes in LDL-cholesterol, and with LDL-cholesterol and triglycerides levels evaluated at 12 months after LSG. **C)** Surgery-induced changes in C-reactive protein levels did not correlate with changes in LDL-cholesterol, and with LDL-cholesterol and triglycerides levels evaluated at 12 months after LSG. Pearson test was applied for correlation analysis.

**DISCUSSION GLOBAL
DELS RESULTATS**

Paper de FGF21 en la fibrosis desenvolupada durant la cardiomiopatia hipertensa

El cor és un òrgan altament sensible als canvis de pressió arterial. Situacions sostingudes d'hipertensió donen lloc a canvis estructurals i funcionals en el cor que provoquen disfunció sistòlica i diastòlica, hipertròfia del ventricle esquerre i insuficiència cardíaca, patologia que es coneix amb el nom de cardiomiopatia hipertensa (Moreno et al., 2017). D'una banda, és molt important conèixer els processos de regulació d'aquest remodelat cardíac per tal de poder controlar-lo i minimitzar-ne el dany. D'altra banda, un altre aspecte fonamental per a la protecció cardíaca és l'estudi de les proteïnes secretades pel miocardi o cardiomiocines, que tenen un paper molt important en la protecció enfront estímuls perjudicials (Planavila et al., 2017). FGF21 és un factor produït i secretat a la circulació sanguínia principalment pel fetge, tot i que altres teixits com els teixits adiposos o múscul també n'expressen (Badman et al., 2007; Itoh, 2014). Inicialment, FGF21 es va estudiar com a regulador metabòlic implicat en la homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina (Fisher and Maratos-Flier, 2016; Staiger et al., 2017). A més, té un paper protector enfront alteracions metabòliques com la diabetis tipus 2, l'obesitat, el fetge gras, etc. (Camacho et al., 2013; Véniant et al., 2012; Zhu et al., 2014a). En els últims anys també s'ha descrit la seva funció com a cardiomiocina. Diversos estudis han demostrat que el cor expressa FGF21 enfront situacions patològiques i que té efectes cardioprotectors (Cong et al., 2013; Planavila et al., 2013; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2015a). Al llarg de la present tesi doctoral hem estudiat el paper de la cardiomiocina FGF21 enfront de la fibrosi cardíaca en el model de la cardiomiopatia hipertensa.

En el moment d'iniciar aquesta tesi ja s'havia descrit l'efecte protector de FGF21 a nivell cardíac en diverses patologies com la hipertròfia cardíaca (Planavila et al., 2013), la cardiomiopatia diabètica (Chen et al., 2018; Tanajak et al., 2016), l'obesitat (Coskun et al., 2008; Rupérez et al., 2018) i l'aterosclerosi (Lin et al., 2015). Malgrat tots aquests estudis, l'efecte de FGF21 durant el desenvolupament de la cardiomiopatia hipertensa no es coneixia

Per tal d'estudiar el paper de FGF21 en un model d'hipertensió vam implantar bombes osmòtiques amb salí o Ang II a ratolins durant una setmana. El nostre estudi mostra un augment dels nivells circulants de FGF21 després del tractament amb Ang II. Prèviament, aquest augment en els nivells circulants de FGF21 ja s'havia descrit en pacients amb hipertensió (Semba et al., 2013; Zhang et al., 2015b). També vam observar, coincidint amb l'article de Pan et al. sobre la cardiomiopatia hipertensa (Pan et al., 2018), la inducció de FGF21 al fetge que actua com a major contribuïdor als nivells circulants. A més a més, el nostre estudi descriu per primera vegada la inducció de FGF21 i del seu co-receptor β -klotho en el cor de ratolins hipertensos, fet que posa en evidència l'activació de la senyalització de FGF21 durant la hipertensió. Així, durant la hipertensió, el cor sembla ser molt sensible a l'acció de FGF21 tant d'origen sistèmic com cardíac.

A continuació, per tal de determinar el paper que té l'augment de FGF21 durant la patogènesi de la cardiomiopatia hipertensa, vam avaluar els efectes de la falta de FGF21 en ratolins sotmesos a hipertensió. Primerament, es va analitzar la relació entre el pes del cor i la mesura de la tibia (HW/TL) per determinar si els animals presentaven hipertròfia cardíaca. Els resultats mostren

que el tractament amb Ang II produeix hipertròfia cardíaca tal i com ja s'ha descrit anteriorment (Byrne et al., 2003; Matsumoto et al., 2013) però no s'observen diferències entre genotips. Aquestes dades es van confirmar amb la mida dels cardiomiòcits. La mida dels cardiomiòcits després del tractament amb Ang II és similar malgrat l'augment només arriba a ser significatiu en els animals WT ja que els animals FGF21 $-/-$ presenten hipertròfia basal. Les dades ecocardiogràfiques van revelar que els animals WT presenten una hipertròfia compensatòria concèntrica mentre que la manca de FGF21 provoca una hipertròfia excèntrica o dilatació juntament amb disfunció cardíaca. Cal destacar que en el nostre estudi, l'Ang II indueix el mateix nivell d'hipertensió als dos genotips a diferència de l'estudi de Pan et al. on descriuen que la manca de FGF21 agreuja la hipertensió. Aquestes discrepàncies poden ser degudes a la utilització de diferents temps de tractament amb l'Ang II, a diferències en la soca o l'edat dels animals (Pan et al., 2018). Per tant, el nostre estudi ens permet determinar el paper directe de la manca de FGF21 durant la cardiomiopatia hipertensa sense canvis en la pressió arterial entre genotips.

Seguidament es va analitzar la fibrosi cardíaca en aquests animals ja que és un altre punt clau del remodelat cardíac induït per la hipertensió. Tant l'expressió gènica de factor claus per l'activació dels miofibroblasts (TGF β 1) com de les fibres de col·lagen (Col3a1, Col6a1) es troben augmentades amb els animals FGF21 $-/-$ després del tractament amb Ang II. La quantificació de les àrees fibròtiques en els talls histològics tenyits amb Trichrome Masson mostra els mateixos resultats. Finalment, per acabar de demostrar el paper de FGF21 en la fibrosi vam tractar cries nounades de ratolí amb ISO o amb ISO i FGF21. El tractament amb FGF21 va permetre revertir la inducció de marcadors de fibrosi cardíaca. De manera, que aquests resultats confirmen el paper protector de FGF21 enfront la fibrosi cardíaca. Durant el transcurs d'aquesta tesi es van publicar diversos articles on també es descrivia l'efecte protector de FGF21 en la fibrosi cardíaca en models d'hipertensió, ja sigui de manera endocrina on FGF21 procedia del BAT (Ruan et al., 2018), a nivell del teixit aòrtic (Pan et al., 2018) o en animals Sirt $-/-$ on es perd l'efecte de FGF21 (Li et al., 2019).

Un cop establert que FGF21 tenia un paper protector en la fibrosi cardíaca vam determinar si es tractava d'un efecte directe sobre els propis fibroblasts o bé indirecte. Per això, es va fer servir el model de fibrosi *in vitro* descrit per Teunissen et al. Es van tractar fibroblasts cardíacs obtinguts en cultiu primari de rates nounades al pas 1 (considerats fibroblasts fisiològics) i també fibroblasts al pas 3 (considerats miofibroblasts) amb FGF21 (Teunissen et al., 2007). Com a validació del model s'observa un augment en l'expressió gènica de α -SMA en els fibroblasts de pas 3 però aquest augment es perd després del tractament amb FGF21. Els resultats demostren que l'efecte protector de FGF21 enfront la fibrosi és per efecte directe sobre els fibroblasts. Aquests resultats *in vitro* han estat confirmats en alguns dels estudis esmentats anteriorment tot i utilitzar diferents protocols per induir fibrosi (Li et al., 2019; Ruan et al., 2018).

El nostre grup havia descrit que el cor és diana tant del FGF21 sistèmic com del cardíac i que té un efecte cardioprotector (Planavila et al., 2013). És possible que efectes locals autocrins i paracrins de FGF21 estiguin implicats en la cardiomiopatia hipertensa. Prèviament, el nostre grup ja havia descrit que els cardiomiòcits són la principal font de FGF21 en el cor i que té efectes

autocrins (Planavila et al., 2013). L'estudi actual demostra com els fibroblasts cardíacs també contribueixen en menor escala a la producció de FGF21 suggerint un efecte paracrí de FGF21 en el cor. Però a la vegada, els fibroblasts cardíacs també són sensibles a l'acció de FGF21 gràcies a l'expressió dels seus receptors i co-receptor. Per tal de confirmar l'efecte paracrí de FGF21 en el cor s'haurien de realitzar més estudis *in vivo* amb models de pèrdua de funció específics a nivell cel·lular o de teixit.

Fins al moment, l'efecte antihipertensiu de FGF21 s'ha atribuït a la seva acció en el sistema nerviós central i al teixit adipós mitjançant l'alliberació de molècules vasodilatadores com la corticosterona i al fetge gràcies a l'activació del metabolisme lipídic (Huang et al., 2017) tal i com s'ha confirmat en animals d'experimentació (He et al., 2016). Per tant, el paper antihipertensiu de FGF21 en ratolins està bastant definit en canvi, en humans hi ha diversos estudis contradictoris sobre l'efecte de l'ús dels anàlegs de FGF21, on alguns han descrit que els anàlegs de FGF21 no afecten la pressió arterial (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016b) mentre que altres n'han descrit un efecte pro-hipertensiu (Kim et al., 2017). Tenint en compte aquests antecedents, vam voler avançar en l'estudi sobre el paper de FGF21 en la hipertensió en humans. Els resultats en pacients amb hipertensió mostren una inducció gradual de l'expressió gènica de FGF21 en el cor al llarg de la cardiomiopatia alcohòlica mostrant que la regulació positiva de FGF21 augmenta al llarg de la patologia. A més, els pacients amb hipertensió també mostren un augment de la fibrosi cardíaca, i una correlació entre els nivells de FGF21 i el grau de fibrosi i hipertròfia posant de manifest que els nostres dos models (animal i humà) segueixen la mateixa tendència. El nostre estudi suggereix que el FGF21 cardíac té un paper important i protector en el desenvolupament de la cardiomiopatia alcohòlica en humans i al igual que s'ha observat en ratolins podria protegir contra la fibrosi cardíaca. De manera que s'haurien de dissenyar nous estudis clínics per avaluar si FGF21 podria ser utilitzat com una diana terapèutica contra la fibrosi cardíaca associada a la hipertensió en humans.

En resum, en aquest estudi demostrem que FGF21 protegeix contra la cardiomiopatia hipertensiva, i, especialment contra la fibrosi cardíaca associada.

Paper de FGF21 en la cardiomiopatia alcohòlica

L'alcohol és un dels principals causants de cardiomiopatia dilatada en països desenvolupats (Guzzo-Merello et al., 2014). El consum crònic d'alcohol afecta al cor provocant dilatació cardíaca, problemes contràctils i una reducció de la fracció d'ejecció juntament amb hipertròfia i fibrosi cardíaca. Aquest conjunt d'afectacions es coneixen com a cardiomiopatia alcohòlica (Piano and Phillips, 2014). És molt important estudiar els mecanismes implicats en aquesta patologia per tal de trobar noves dianes terapèutiques per combatre-la. En aquest cas, també resulta rellevant el paper cardioprotector de FGF21 descrit anteriorment enfront situacions patològiques (Cong et al., 2013; Planavila et al., 2013; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2015a). Per aquest motiu, al llarg de la present tesi doctoral hem estudiat el paper de la cardiomicina FGF21 enfront la cardiomiopatia alcohòlica.

En el moment d'iniciar aquesta tesi s'havia descrit l'efecte protector de FGF21 en el dany hepàtic induït per l'alcohol (Chen et al., 2017; Desai et al., 2017; Zhu et al., 2014a) però l'efecte de FGF21 durant el desenvolupament de la cardiomiopatia alcohòlica era totalment desconegut.

Primerament, vam treballar amb mostres de pacients amb alcoholisme en les quals vam identificar un augment dels nivells circulants de FGF21 després del consum crònic d'alcohol. En aquest context, ja s'havia descrit l'augment dels nivells circulants de FGF21 en pacients amb problemes hepàtics degut a l'alcohol (Liu et al., 2016). A més, vam descriure per primera vegada l'augment gradual de l'expressió de FGF21 i β -klotho en biòpsies cardíques al llarg del desenvolupament de la cardiomiopatia alcohòlica en aquests pacients, apuntant la importància de FGF21 en aquesta patologia.

Per tal d'estudiar el paper de FGF21 en un model animal de consum crònic d'alcohol es van alimentar ratolins WT i Fgf21 $-/-$ amb una dieta líquida control o amb una dieta líquida amb un 4% d'alcohol durant 12 setmanes. El nostre estudi mostra un augment dels nivells circulants de FGF21 així com un augment en l'expressió gènica de FGF21 en fetge i cor. Altres estudis anteriors ja havien descrit l'augment circulant de FGF21 i l'augment de l'expressió gènica de FGF21 en el fetge validant el nostre model (Desai et al., 2017; Liu et al., 2016). Tenint en compte, la gran aportació de FGF21 per part del fetge i sobretot en aquest model on el fetge té un paper molt important en la detoxificació de l'alcohol es pot considerar que el fetge és l'òrgan encarregat de l'augment dels nivells circulants. Malgrat això no es pot descartar una petita aportació del cor a aquests nivells circulants. A més, s'observa la tendència a incrementar l'expressió gènica de β -klotho en cor posant de manifest l'activació del sistema de FGF21 enfront del dany cardíac induït per l'alcohol al igual que passava en els pacients amb alcoholisme. El cor és sensible tant als nivells endocrins com autocrins de FGF21.

Seguidament, per tal de desvetllar el paper de FGF21 durant la cardiomiopatia alcohòlica, vam avaluar els efectes de la manca de FGF21 en ratolins sotmesos a un consum crònic d'alcohol. Les dades de la relació HW/TL i de les ecocardiografies posen de manifest que els animals WT presenten una hipertròfia compensatòria després del consum crònic d'alcohol mentre que els animals Fgf21 $-/-$ presenten una hipertròfia cardíaca amb una clara disfunció diastòlica. A nivell de fibrosis cardíaca, els animals Fgf21 $-/-$ presenten una major afectació tal i com ja havíem descrit en el model d'hipertensió.

A continuació, es va avaluar el metabolisme lipídic a nivell cardíac ja que s'ha descrit que es troba alterat durant la cardiomiopatia alcohòlica (Hu et al., 2013). S'observa que l'alcohol indueix l'expressió dels transportadors d'àcids grassos a l'interior de la cèl·lula a ambdós genotips mentre que els gens d'oxidació d'aquests àcids grassos estan disminuïts en els animals Fgf21 $-/-$. A més, els animals Fgf21 $-/-$ també presenten una disminució del transportador de glucosa, Glut1. Aquestes dades en conjunt, manifesten que els animals Fgf21 $-/-$ tenien la funció cardíaca compromesa durant la cardiomiopatia alcohòlica agreujant així el dany cardíac.

Finalment, vam analitzar la funció mitocondrial i l'estrès oxidatiu ja que són unes de les principals afectacions en aquesta patologia (Piano and Phillips, 2014; Steiner and Lang, 2017). Les imatges

de microscòpia electrònica mostren mitocondris alterats únicament en els animals *Fgf21* $-/-$ després del consum d'alcohol i no en els WT. Els animals *Fgf21* $-/-$ també mostren una disminució en l'expressió gènica dels complexos de la cadena respiratòria i en l'activitat del complex IV juntament amb una tendència a augmentar els nivells d'estrès oxidatiu (MDA) i de les defenses antioxidants. La relació entre l'estrès oxidatiu i l'activitat del complex IV ens informa sobre la quantitat d'estrès oxidatiu que es genera en cada cicle de la cadena respiratòria mostrant una tendència a augmentar aquesta relació en els animals *Fgf21* $-/-$ i confirmant la disfunció mitocondrial. S'ha descrit extensament com l'alcohol incrementa l'estrès oxidatiu o provoca disfunció mitocondrial malgrat que en el nostre estudi no observem part d'aquestes afectacions en els animals WT, segurament per diferències en la dosi d'alcohol utilitzada i el temps de tractament (Hu et al., 2013) (Matyas et al., 2016). Finalment, també vam determinar els nivells d'estrès oxidatiu i dany mitocondrial en els pacients alcohòlics. Els pacients amb alcoholisme al igual que el model animal mostren un augment gradual dels nivells d'estrès oxidatiu al llarg del desenvolupament de la cardiomiopatia alcohòlica acompanyada d'un augment de les defenses antioxidants per combatre aquesta situació i una disminució progressiva de la funció mitocondrial. Tot i això aquest estudi va més enllà ja que correlaciona els nivells d'estrès oxidatiu amb l'expressió de FGF21 al miocardi dels pacients amb alcoholisme. Els nivells d'expressió de FGF21 en el miocardi també correlacionen amb la hipertròfia cardíaca i la fibrosis tal i com havíem vist en els pacients hipertensos. Tot això assenyala a FGF21 com un possible biomarcador de la cardiomiopatia alcohòlica en humans.

En aquest estudi descrivim els efectes cardíacs de la manca de FGF21 en la cardiomiopatia alcohòlica. Encara que en els últims anys s'ha descrit que FGF21 actua a nivell central inhibint la preferència de l'alcohol tant en animals d'experimentació com en humans (Schumann et al., 2016; Sjøberg et al., 2017; Talukdar et al., 2016a) sembla poc probable que el major dany cardíac observat en els animals *Fgf21* $-/-$ sigui degut a un efecte central ja que vam subministrar la mateixa quantitat d'alcohol a ambdós genotips precisament per evitar aquest efecte. L'estudi també mostra com la manca de FGF21 accentua la disfunció mitocondrial. Malgrat s'haurien de dissenyar nous experiments per confirmar aquesta hipòtesi, Tanajak et al. van descriure com el tractament amb FGF21 permetia millorar la funcionalitat mitocondrial en rates prediabètiques reforçant els nostres resultats. A més, el fet que els nivells circulants de FGF21 s'utilitzin com a biomarcador de patologies mitocondrials (Itoh, 2014; Lehtonen et al., 2016) i que el múscul expressi i secreti FGF21 en resposta a patologies mitocondrials (Dogan et al., 2014) estan en acord amb la nostra hipòtesi. Finalment, també hem descrit per primera vegada la relació entre FGF21 i l'estrès oxidatiu en la cardiomiopatia alcohòlica tot i que ja es coneixia que FGF21 protegeix contra l'estrès oxidatiu en altres patologies (Planavila et al., 2015b). El fet que FGF21 protegeixi contra el dany hepàtic associat a l'alcohol contrarestant l'estrès oxidatiu (Liu et al., 2016; Zhu et al., 2014a) valida els nostres resultats a nivell cardíac on sembla que FGF21 també activaria les defenses antioxidants durant la cardiomiopatia alcohòlica.

En resum, en aquest estudi mostrem que FGF21 actua a nivell cardíac protegint contra la cardiomiopatia alcohòlica i especialment activant les defenses antioxidants del miocardi.

Paper de Metrnl i l'OSM en l'obesitat com a risc cardiovascular

L'obesitat consisteix en una acumulació excessiva de greix que provoca alteracions a nivell estructural i funcional fins a generar un teixit adipós disfuncional. Aquest procés va acompanyat d'una inflamació sistèmica, resistència a la insulina, augment de la glicèmia, diabetis tipus 2 i risc cardiovascular (Bays, 2014; Fuster et al., 2016; Reaven, 2011). En aquest tipus de patologies és molt important determinar els mecanismes implicats en la regulació de la homeòstasi metabòlica i el correcte funcionament del teixit adipós. Fa uns anys, es va descobrir que la proteïna Metrnl actua com a regulador metabòlic millorant la sensibilitat a la insulina i la despesa energètica (Zheng et al., 2016). Un altre factor implicat en l'obesitat i la regulació metabòlica és l'OSM (Piquer-Garcia et al., 2019; Sanchez-Infantes et al., 2014; Sánchez-Infantes et al., 2017). Per altra banda, en els últims anys ha augmentat el nombre de cirurgies bariàtriques per combatre l'obesitat i revertir les malalties associades com la diabetis tipus 2 (Frühbeck, 2015). Per això, al llarg d'aquesta tesi s'ha estudiat el paper de Metrnl i l'OSM en pacients amb obesitat i al llarg del post operatori en pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica (6 i 12 mesos).

Aquest estudi s'ha pogut realitzar gràcies a la col·laboració amb el grup del Dr. David Sánchez de l'Hospital Germans Trias i Pujol. L'estudi consta de 33 individus controls amb normopès (IMC: $22.6 \text{ kg/m}^2 \pm 2.7$) i 25 pacients amb obesitat severa abans de sotmetre's a la cirurgia (IMC: $42.3 \text{ kg/m}^2 \pm 6.2$). Es va recollir sèrum dels individus control i dels pacients amb obesitat just abans de la cirurgia i després als 6 i 12 mesos post cirurgia. Als 12 mesos després de la cirurgia els pacients amb obesitat mostren una clara disminució en l'IMC ($30.6 \text{ kg/m}^2 \pm 1.2$), els nivells circulants de glucosa ($90 \text{ mg/dl} \pm 14$), d'insulina ($7.3 \text{ mIU/l} \pm 3.6$), d'hemoglobina glicosilada ($5.25\% \pm 0.28$), HOMA-IR (1.64 ± 0.81), de TAG circulants ($84 \text{ mg/dl} \pm 37$) i de proteïna C reactiva (-0.23 log mg/l) arribant en alguns casos a valors similars als individus control. Tots aquests paràmetres indiquen que la cirurgia bariàtrica ha permès recuperar la sensibilitat a la insulina i millorar el perfil lipídic revertint la diabetis tipus 2, en aquells pacients que en presentaven. Aquests resultats coincideixen amb diversos estudis que ja han demostrat que la cirurgia bariàtrica no només serveix per reduir el pes corporal de forma ràpida sinó que també reverteix la diabetis tipus 2 i millora el perfil metabòlic (Cummings and Cohen, 2016; Pi-Sunyer et al., 2007).

Al analitzar els nivells circulants de Metrnl, s'observa que estan disminuïts en els pacients amb obesitat just abans de la cirurgia bariàtrica en comparació amb els individus control. Per contra, aquests nivells van augmentant de forma gradual després de la cirurgia bariàtrica arribant a un increment significatiu als 12 mesos, tot i que no s'assoleixen els nivells dels individus control. Malgrat això, aquest augment dels nivells circulants als 12 mesos després de la cirurgia correlaciona negativament i de forma significativa amb els nivells d'hemoglobina glicosilada ($p=0.01$), insulina ($p=0.02$) i l'índex de resistència a la insulina o HOMA-IR ($p=0.004$). Els resultats suggereixen que Metrnl ha tingut un paper important en la millora metabòlica produïda després de la cirurgia. Al llarg d'aquesta tesi han aparegut diversos articles contradictoris sobre els nivells circulants de Metrnl en pacients amb diabetis tipus 2 (Chung et al., 2018; Dadmanesh et al., 2018; El-Ashmawy et al., 2019; Lee et al., 2018; Wang et al., 2019). En el nostre estudi no hem trobat diferències en els nivells de Metrnl entre els pacients amb obesitat amb normoglicèmia i els que

presentaven diabetis tipus 2. En el nostre cas el baix nombre de pacients en cada grup, ja que aquest no era l'objectiu del nostre estudi i el grau d'obesitat molt severa amb greus alteracions metabòliques, en comparació als pacients d'altres estudis podrien ser les causes de les diferències observades. Tot i això, el nostre estudi coincideix amb la correlació negativa dels nivells de Metrnl amb diferents paràmetres metabòlics (nivells d'insulina i l'índex HOMA) descrita en els pacients amb diabetis tipus 2 (Chung et al., 2018; Dadmanesh et al., 2018; El-Ashmawy et al., 2019; Lee et al., 2018; Liu et al., 2019).

Durant el post operatori de la cirurgia bariàtrica, es produeix un increment de la despesa energètica per tal de reduir el pes corporal. En animals, s'ha descrit que el TAM és el principal encarregat d'augmentar la despesa energètica i millorar la homeòstasi de la glucosa i lípids per protegir contra la HFD i l'obesitat (Vegiopoulos et al., 2010). Recentment, s'ha descrit que en humans adults el TAM s'activa amb el fred i després de la cirurgia bariàtrica (Dadson et al., 2018; Lichtenbelt et al., 2009; Rachid et al., 2015; Vijgen et al., 2012). Els nostres resultats suggereixen que l'activació del TAM en els pacients amb obesitat estaria modulada per l'acció de Metrnl. Malgrat que aquesta hipòtesi no està corroborada en humans, si que ho està en models animals. De fet, s'ha descrit el paper de Metrnl promovent el *browning* en models de ratolins (Rao et al., 2014) malgrat Loofer et al. nega l'activació del *browning* en condicions *in vitro* en adipòcits humans. Per altra banda, s'ha vist que la implantació d'adipòcits beix humans millora la glicèmia en ratolins sotmesos a una HFD. Tenint en compte tot aquest conjunt de dades s'haurien de dissenyar nous estudis per avaluar l'efecte real dels nivells circulants de Metrnl en l'activació del TAM o *browning* després de la cirurgia bariàtrica en humans.

Al analitzar els nivells circulants d'OSM, s'observa que estan augmentats en els pacients just abans de la cirurgia en comparació als individus control. En canvi, els nivells van disminuint de forma gradual després de la cirurgia i aquesta disminució arriba a ser significativa als 12 mesos. La disminució dels nivells d'OSM als 12 mesos correlaciona positivament i de forma significativa amb els nivells de LDL ($r=0.56$, $p=0.01$) i de triglicèrids ($r=0.43$, $p=0.04$) mostrant una millora en el metabolisme lipídic malgrat que aquestes són les dades sense ajustar, i després d'ajustar per paràmetres d'abans de la cirurgia (BMI, edat, sexe i diabetis tipus 2) algunes correlacions es tornen més dèbils. A més a més, als 12 mesos l'OSM també correlaciona amb els nivells d'insulina ($r=-0.50$, $p=0.03$) malgrat que aquesta correlació deixa de ser significativa després de l'ajustament. Aquest resultat coincideix amb un estudi clínic publicat recentment amb pacients amb resistència a la insulina on es suggereix que es pot substituir l'índex HOMA IR pels nivells circulants d'OSM ja que correlacionen positivament (Akarsu et al., 2019). En el nostre estudi els nivells circulants d'OSM també van disminuint després de la cirurgia paral·lelament a l'índex HOMA IR. En resum, el nostre estudi mostra que la disminució de l'OSM va associada a una millora del metabolisme lipídic i de la insulina suggerint que la reducció de l'OSM té efectes beneficiosos a nivell metabòlic. Altres estudis avalen aquests resultats ja que la neutralització de l'OSM en animals sotmesos a una HFD permet millorar els nivells circulants de glucosa (Piquer-Garcia et al., 2019) i l'ús d'antagonistes de l'OSM han permès millorar la diabetis tipus 2 restaurant la funció de la mèdulla òssia (Albiero et al., 2015). Malgrat que la sensibilització a la

insulina va associada a una disminució de la inflamació i de la hiperlipèmia, en aquest estudi no s'ha pogut associar la disminució de citocines pro-inflamatòries (TNF α , IL-6, CRP) amb la millora del metabolisme lipídic (LDL i triglicèrids).

Per altre banda, s'ha relacionat l'OSM amb la despesa energètica en models animals. Concretament, s'ha descrit que actua inhibint el *browning* en situacions de fred i que impedeix l'activació del TAM en models d'obesitat (Sánchez-Infantes et al., 2017). A més a més, en humans s'ha descrit l'augment de l'activitat del TAM en pacients amb obesitat després de ser sotmesos a una cirurgia bariàtrica (Vijgen et al., 2012). De manera, que els nostres resultats suggereixen que la disminució de l'OSM podria ser l'encarregada de la reactivació del TAM en pacients amb obesitat després de la cirurgia bariàtrica.

La forta correlació negativa entre Metrnl i OSM ($r=-0.51$, $p=0.009$) reforça la hipòtesi de l'activació del TAM després de la cirurgia bariàtrica. Els resultats d'aquest estudi plantegen que modular els nivells circulants de Metrnl i OSM podria ser una nova estratègia per combatre l'obesitat i la diabetis tipus 2. Cal remarcar que el nostre estudi s'ha realitzat en pacients sotmesos a una gastrectomia laparoscòpica de màniga, de manera que s'hauria de comprovar el paper de Metrnl i l'OSM en els altres tipus de cirurgies bariàtriques.

CONCLUSIONS

12. CONCLUSIONS

Paper de FGF21 en la cardiomiopatia hipertensa

1. FGF21 és una cardiomiocina produïda en resposta a la hipertensió.
2. La manca de FGF21 produeix un augment de la fibrosi cardíaca juntament amb un augment de la disfunció cardíaca degut en part a la presència d'un major estrès oxidatiu durant la hipertensió.
3. FGF21 protegeix contra la fibrosi cardíaca a través d'un efecte autocrí o paracrí sobre els fibroblasts cardíacs.
4. Els pacients hipertensos presenten un augment dels nivells de FGF21 en el cor, el qual correlaciona amb la severitat de la fibrosi cardíaca i la hipertròfia.

En resum, s'ha identificat FGF21 com una cardiomiocina produïda pel cor en resposta a la hipertensió, amb acció autocrina o paracrina que actua protegint contra la fibrosi cardíaca.

Paper de FGF21 en la cardiomiopatia alcohòlica

5. FGF21 és una cardiomiocina produïda en resposta al consum crònic d'alcohol.
6. La manca de FGF21 provoca un augment en la fibrosi cardíaca i una disfunció diastòlica després de la ingesta crònica d'alcohol.
7. FGF21 està implicat en la regulació del metabolisme cardíac d'àcids grassos i de glucosa, de l'estrès oxidatiu i de la funció mitocondrial durant el consum crònic d'alcohol.
8. En humans, s'ha correlacionat els nivells de FGF21 en el miocardi amb la presència d'hipertròfia i fibrosi cardíaca i també amb els nivells d'estrès oxidatiu durant la cardiomiopatia alcohòlica.

En resum, s'ha identificat FGF21 com una cardiomiocina produïda pel cor en resposta al consum crònic d'alcohol que actua sobretot activant les defenses antioxidants per protegir contra la cardiomiopatia alcohòlica.

Paper de Metrnl i l'OSM en l'obesitat com a risc cardiovascular

9. La cirurgia bariàtrica comporta una millora del perfil metabòlic així com canvis en els nivells de Metrnl i d'OSM.
10. Els nivells de Metrnl es troben disminuïts en pacients amb obesitat i augmenten de forma progressiva després de sotmetre's a cirurgia bariàtrica mentre que els nivells d'OSM es troben augmentats en pacients amb obesitat i disminueixen de forma gradual després de sotmetre's a cirurgia bariàtrica.
11. Els canvis de Metrnl i d'OSM durant el post operatori de la cirurgia bariàtrica s'associen a una millora metabòlica.

Conclusions

En resum, s'ha identificat com la cirurgia bariàtrica modula els nivells de Metrnl i d'OSM. Aquests canvis es poden interpretar com una resposta de l'organisme per tal d'augmentar la despesa energètica i millorar el perfil metabòlic activant el TAM.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, A.C., Halstead, C.A., Hansen, B.C., Irizarry, A.R., Martin, J.A., Myers, S.R., Reynolds, V.L., Smith, H.W., Wroblewski, V.J., and Kharitonov, A. (2013). LY2405319, an Engineered FGF21 Variant, Improves the Metabolic Status of Diabetic Monkeys. *PLoS One* 8, 1–7.
- Akarsu, M., Hurşitoğlu, M., Toprak, Z., Yoldemir, Ş.A., Altun, Ö., Toprak, I.D., Özcan, M., Yürüyen, G., Uğurlukişi, B., Erdem, M.G., et al. (2019). Relationships among oncostatin M, insulin resistance, and chronic inflammation: a pilot study. *Arch Endocrinol Metab* 1–7.
- Albiero, M., Poncina, N., Ciciliot, S., Cappellari, R., Menegazzo, L., Ferraro, F., Bolego, C., Cignarella, A., Avogaro, A., and Fadini, G.P. (2015). Bone marrow macrophages contribute to diabetic stem cell mobilopathy by producing oncostatin M. *Diabetes* 64, 2957–2968.
- Aoki, T., Fukumoto, Y., Sugimura, K., Oikawa, M., Satoh, K., Nakano, M., Nakayama, M., and Shimokawa, H. (2011). Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure: Comparison between preserved and reduced ejection fraction heart failure. *Circ J* 75, 2605–2613.
- Arany, Z., Novikov, M., Chin, S., Ma, Y., Rosenzweig, A., and Spiegelman, B.M. (2006). Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10086–10091.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab* 5, 426–437.
- Bae, J.Y., Woo, J., Kang, S., and Shin, K.O. (2018). Effects of detraining and retraining on muscle energy-sensing network and meteorin-like levels in obese mice. *Lipids Health Dis* 17, 1–9.
- Barcellos-Hoff, M.H., and Dix, T.A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Mol Endocrinol* 10, 1077–1083.
- Barry, S.P., Davidson, S.M., and Townsend, P.A. (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2023–2039.
- Bays, H. (2014). Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21, 345–351.
- Beamish, A.J., Olbers, T., Kelly, A.S., and Inge, T.H. (2016). Cardiovascular effects of bariatric surgery. *Nat Rev Cardiol* 13, 730–743.
- Behr, T.M., Willette, R.N., Coatney, R.W., Berova, M., Angermann, C.E., Anderson, K., Sackner-Bernstein, J.D., and Barone, F.C. (2004). Eprosartan improves cardiac performance, reduces cardiac hypertrophy and mortality and downregulates myocardial monocyte chemoattractant protein-1 and inflammation in hypertensive heart disease. *J Hypertens* 22, 583–592.
- Berchtold, S., Moriggl, R., Gouilleux, F., Silvennoinen, O., Beisenherz, C., Pfitzner, E., Wissler, M., Stöcklin, E., and Groner, B. (1997). Cytokine receptor-independent, constitutively active variants of STAT5. *J Biol Chem* 272, 30237–30243.
- Berenji, K., Drazner, M.H., Rothermel, B.A., and Hill, J.A. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 289, 8–16.
- Berk, B.C., Fujiwara, K., and Lehoux, S. (2007). Review series ECM remodeling in hypertensive

heart disease. *117*.

Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* *128*, 191–227.

Van Bilsen, M., Van Nieuwenhoven, F.A., and Van Der Vusse, G.J. (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: Beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* *81*, 420–428.

Blanchard, F., Wang, Y., Kinzie, E., Duplomb, L., Godard, A., and Baumann, H. (2001). Oncostatin M Regulates the Synthesis and Turnover of gp130, Leukemia Inhibitory Factor Receptor α , and Oncostatin M Receptor β by Distinct Mechanisms. *J Biol Chem* *276*, 47038–47045.

Bleumink, G.S., Knetsch, A.M., Sturkenboom, M.C.J.M., Straus, S.M.J.M., Hofman, A., Deckers, J.W., Witteman, J.C.M., and Stricker, B.H.C. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - The Rotterdam Study. *Eur Heart J* *25*, 1614–1619.

Bookout, A.L., De Groot, M.H.M., Owen, B.M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Takahashi, J.S., Mangelsdorf, D.J., et al. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* *19*, 1147–1152.

Bowman, J.C., Steinberg, S.F., Jiang, T., Geenen, D.L., Fishman, G.I., and Buttrick, P.M. (1997). Expression of protein kinase C β in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* *100*, 2189–2195.

Braz, J.C., Bueno, O.F., De Windt, L.J., and Molkenkin, J.D. (2002). PKC α regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol* *156*, 905–919.

Braz, J.C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Nairn, A.C., Liggett, S.B., et al. (2004). PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* *10*, 248–254.

Bromfield, S. (2014). High Blood Pressure: The Leading Global Burden of Disease Risk Factor and the Need for Worldwide Prevention Programs. *Curr Hypertens Rep* *15*, 134–136.

Bueno, O.F., De Windt, L., Tymitz, K., Witt, S., Kimball, T., Klevitsky, R., Hewett, T., Jones, S., Lefer, D., Peng, C., et al. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* *19*, 6341–6350.

Byrne, J.A., Grieve, D.J., Bendall, J.K., Li, J.M., Gove, C., Lambeth, J.D., Cave, A.C., and Shah, A.M. (2003). Contrasting Roles of NADPH Oxidase Isoforms in Pressure-Overload Versus Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* *93*, 802–804.

Camacho, R.C., Zafian, P.T., Achanfuo-Yeboah, J., Manibusan, A., and Berger, J.P. (2013). Pegylated Fgf21 rapidly normalizes insulin-stimulated glucose utilization in diet-induced insulin resistant mice. *Eur J Pharmacol* *715*, 41–45.

Canoy, D., Boekholdt, S.M., Wareham, N., Luben, R., Welch, A., Bingham, S., Buchan, I., Day, N., and Khaw, K.T. (2007). Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the european prospective investigation into cancer and nutrition in norfolk cohort: A population-based prospective study. *Circulation* *116*, 2933–2943.

- Chartoumpakis, D. V, Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., and Papavassiliou, A.G. (2011). Brown Adipose Tissue Responds to Cold and Adrenergic Stimulation by Induction of FGF21. *Mol Med* 17, 736–740.
- Chen, C., Meng, Z., Zheng, Y., Hu, B., and Shen, E. (2018). Fibroblast growth factor 21 inhibition aggravates cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy by improving lipid accumulation. *Exp Ther Med* 15, 75–84.
- Chen, X., Ward, S.C., Cederbaum, A.I., Xiong, H., and Lu, Y. (2017). Alcoholic fatty liver is enhanced in CYP2A5 knockout mice: The role of the PPAR α -FGF21 axis. *Toxicology* 379, 12–21.
- Cheng, P., Zhang, F., Yu, L., Lin, X., He, L., Li, X., Lu, X., Yan, X., Tan, Y., and Zhang, C. (2016). Physiological and pharmacological roles of FGF21 in cardiovascular diseases. *J Diabetes Res* 2016.
- Cheng, T.H., Cheng, P.Y., Shih, N.L., Chen, I.B., Wang, D.L., and Chen, J.J. (2003). Involvement of Reactive Oxygen Species in Angiotensin II-Induced Endothelin-1 Gene Expression in Rat Cardiac Fibroblasts. *J Am Coll Cardiol* 42, 1845–1854.
- Chou, R.H., Huang, P.H., Hsu, C.Y., Chang, C.C., Leu, H.B., Huang, C.C., Chen, J.W., and Lin, S.J. (2016). Circulating fibroblast growth factor 21 is associated with diastolic dysfunction in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Sci Rep* 6, 1–10.
- Choukroun, G., Hajjar, R., Kyriakis, J.M., Bonventre, J. V., Rosenzweig, A., and Force, T. (1998). Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 102, 1311–1320.
- Choukroun, G., Hajjar, R., Fry, S., Del Monte, F., Haq, S., Guerrero, J.L., Picard, M., Rosenzweig, A., and Force, T. (1999). Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH2-terminal kinases. *J Clin Invest* 104, 391–398.
- Chung, H.S., Hwang, S.Y., Choi, J.H., Lee, H.J., Kim, N.H., Yoo, H.J., Seo, J.A., Kim, S.G., Kim, N.H., Baik, S.H., et al. (2018). Implications of circulating Meteorin-like (Metrnl) level in human subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 136, 100–107.
- Cildir, G., Akincilar, S.C., and Tergaonkar, V. (2013). Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. *Trends Mol Med* 19, 487–500.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347–2355.
- Clerk, A., and Sugden, P.H. (1999). Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am J Cardiol* 83, 64–69.
- Clerk, A., and Sugden, P.H. (2000). Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res* 86, 1019–1023.
- Coate, K.C., Hernandez, G., Thorne, C.A., Sun, S., Le, T.D.V., Vale, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2017). FGF21 Is an Exocrine Pancreas Secretagogue. *Cell Metab* 25, 472–480.
- Cohn, J.N., Bristow, M.R., Chien, K.R., Colucci, W.S., Frazier, O.H., Leinwand, L.A., Lorell, B.H., Moss, A.J., Sonnenblick, E.H., Walsh, R.A., et al. (1997). Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation* 95, 766–770.

- Cong, W.-T., Ling, J., Tian, H.-S., Ling, R., Wang, Y., Huang, B.-B., Zhao, T., Duan, Y.-M., Jin, L.-T., and Li, X.K. (2013). Proteomic study on the protective mechanism of fibroblast growth factor 21 to ischemia–reperfusion injury. *Can J Physiol Pharmacol* *91*, 973–984.
- Cook, S.A., Sugden, P.H., and Clerk, A. (1999). Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* *31*, 1429–1434.
- Cooper, G. (1987). Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu Rev Physiol* *49*, 501–518.
- Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* *149*, 6018–6027.
- Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., et al. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* *110*, 737–749.
- Cummings, D.E., and Cohen, R. V. (2016). Bariatric/Metabolic surgery to treat type 2 diabetes in patients with a bmi <35 kg/m². *Diabetes Care* *39*, 924–933.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G.M., et al. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med* *360*, 1509–1517.
- D’Angelo, D., Sakata, Y., Lorenz, J., Boivin, G., Walsh, R., Liggett, S., and Dorn, G. (1997). Transgenic Galpha q overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci* *94*, 8121–8126.
- Dadmanesh, M., Aghajani, H., Fadaei, R., and Ghorban, K. (2018). Lower serum levels of Meteorin-like/Subfatin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus are negatively associated with insulin resistance and inflammatory cytokines. *PLoS One* *13*, 1–10.
- Dadson, P., Hannukainen, J.C., Din, M.U., Lahesmaa, M., Kalliokoski, K.K., Iozzo, P., Pihlajamäki, J., Karlsson, H.K., Parkkola, R., Salminen, P., et al. (2018). Brown adipose tissue lipid metabolism in morbid obesity: Effect of bariatric surgery-induced weight loss. *Diabetes, Obes Metab* *20*, 1280–1288.
- Dai, D.F., Johnson, S.C., Villarin, J.J., Chin, M.T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D.J., Dorn, G.W., Kang, Y.J., Prolla, T.A., et al. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and gαq overexpression-induced heart failure. *Circ Res* *108*, 837–846.
- Dalekos, G.N., Elisaf, M., Bairaktari, E., Tsolas, O., and Siamopoulos, K.C. (1997). Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J Lab Clin Med* *129*, 300–308.
- Degirolamo, C., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2016). Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov* *15*, 51–69.
- DeLeon-Pennell, K.Y., Meschiari, C.A., Jung, M., and Lindsey, M.L. (2017). Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. In *Progress in Molecular Biology*

and Translational Science, (Elsevier B.V.), pp. 75–100.

Deller, M.C., Hudson, K.R., Ikemizu, S., Bravo, J., Jones, E.Y., and Heath, J.K. (2000). Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure* 8, 863–874.

Desai, B.N., Singhal, G., Watanabe, M., Stevanovic, D., Lundasen, T., Fisher, ffolliott M., Mather, M.L., Vardeh, H.G., Douris, N., Adams, A.C., et al. (2017). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is robustly induced by ethanol and has a protective role in ethanol associated liver injury. *Mol Metab* 6, 1395–1406.

Dickhout, J.G., Carlisle, R.E., and Austin, R.C. (2011). Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: Endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circ Res* 108, 629–642.

Díez, J., Querejeta, R., López, B., González, A., Larman, M., and Martínez Ubago, J.L. (2002). Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 105, 2512–2517.

Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B.M., Bookout, A.L., Coate, K.C., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2012). β Kslotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism. *Cell Metab* 16, 387–393.

Dogan, S.A., Pujol, C., Maiti, P., Kukat, A., Wang, S., Hermans, S., Senft, K., Wibom, R., Rugarli, E.I., and Trifunovic, A. (2014). Tissue-specific loss of DARS2 activates stress responses independently of respiratory chain deficiency in the heart. *Cell Metab* 19, 458–469.

Dolegowska, K., Marchelek-Mysliwiec, M., Nowosiad-Magda, M., Slawinski, M., and Dolegowska, B. (2019). FGF19 subfamily members: FGF19 and FGF21. *J Physiol Biochem*.

Dong, J.Q., Rossulek, M., Somayaji, V.R., Baltrukonis, D., Liang, Y., Hudson, K., Hernandez-Illas, M., and Calle, R.A. (2015). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PF-05231023, a novel long-acting FGF21 mimetic, in a first-in-human study. *Br J Clin Pharmacol* 80, 1051–1063.

Drazner, M.H. (2011). The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 123, 327–334.

Drechsler, J., Grötzinger, J., and Hermanns, H.M. (2012). Characterization of the rat oncostatin m receptor complex which resembles the human, but differs from the murine cytokine receptor. *PLoS One* 7, 1–12.

Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martinez-Chantar, M.L., and Maratos-Flier, E. (2010). Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 139, 456–463.

Eaton, M., Granata, C., Barry, J., Safdar, A., Bishop, D., and Little, J.P. (2018). Impact of a single bout of high-intensity interval exercise and short-term interval training on interleukin-6, FNDC5, and METRN mRNA expression in human skeletal muscle. *J Sport Heal Sci* 7, 191–196.

Edwards, B.S., Zimmerman, R.S., Schwab, T.R., Heublein, D.M., and Burnett, J.C. (1988). Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 62, 191–195.

Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T.Y., Ruan, H., Wang, Y., Toro, L., and Stefani, E. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 96, 1208–1216.

- El-Ashmawy, H.M., Selim, F.O., Hosny, T.A.M., and Almassry, H.N. (2019). Association of low serum Meteorin like (Metrnl) concentrations with worsening of glucose tolerance, impaired endothelial function and atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract* 150, 57–63.
- Elks, C.M., Stephens, J.M., and Stephens, J.M. (2015). Oncostatin M modulation of lipid storage. *Biology (Basel)* 4, 151–160.
- Elks, C.M., Zhao, P., Grant, R.W., Hang, H., Bailey, J.L., Burk, D.H., McNulty, M.A., Mynatt, R.L., and Stephens, J.M. (2016). Loss of Oncostatin M Signaling in Adipocytes Induces Insulin Resistance and Adipose Tissue Inflammation in Vivo*. *J Biol Chem* 291, 17066–17076.
- Fahimi, H.D., Kino, M., Hicks, L., Thorp, K.A., and Abelman, W.H. (1979). Increased myocardial catalase in rats fed ethanol. *Am J Pathol* 96, 373–390.
- Fan, W., and Evans, R. (2015). PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 33, 49–54.
- Fernández-Solà, J. (2015). Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nat Rev Cardiol* 12, 576–587.
- Fernández-Solà, J., and Porta, A.P. (2016). New treatment strategies for alcohol-induced heart damage. *Int J Mol Sci* 17.
- Fernández-Solà, J., Fatjó, F., Sacanella, E., Estruch, R., Bosch, X., Urbano-Márquez, A., and Nicolás, J.M. (2006). Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Hum Pathol* 37, 1100–1110.
- Fernández-Solà, J., Lluís, M., Sacanella, E., Estruch, R., Antúnez, E., and Urbano-Márquez, A. (2011). Increased Myostatin Activity and Decreased Myocyte Proliferation in Chronic Alcoholic Cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 35, 1220–1229.
- Fillmore, N., Mori, J., and Lopaschuk, G.D. (2014). Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 171, 2080–2090.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* 78, 223–241.
- Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitonov, A., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 59, 2781–2789.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol Endocrinol* 24, 2050–2064.
- Fox, C.S., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Pou, K.M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C.-Y., Vasan, R.S., Murabito, J.M., Meigs, J.B., Cupples, L.A., et al. (2007). Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Compartments. *Circulation* 116, 39–48.
- Frangogiannis, N.G. (2019). Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med* 65, 70–99.
- Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H.I., De Keulenaer, G.W., Tschöpe, C., Leite-Moreira, A.F., Musters, R., Niessen, H.W.M., Linke, W.A., et al. (2016). Myocardial Microvascular

- Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Hear Fail* 4, 312–324.
- Frühbeck, G. (2015). Bariatric and metabolic surgery: A shift in eligibility and success criteria. *Nat Rev Endocrinol* 11, 465–477.
- Fuster, J.J., Ouchi, N., Gokce, N., and Walsh, K. (2016). Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circ Res* 118, 1786–1807.
- Gadde, K.M., Martin, C.K., Berthoud, H.R., and Heymsfield, S.B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am Coll Cardiol* 71, 69–84.
- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* 18, 333–340.
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Åmark, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2008). The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR α Activation in Man. *Cell Metab* 8, 169–174.
- Ge, X., Chen, C., Hui, X., Wang, Y., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2011). Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *J Biol Chem* 286, 34533–34541.
- Gealekman, O., Guseva, N., Hartigan, C., Apotheker, S., Gorgoglione, M., Gurav, K., Tran, K. Van, Straubhaar, J., Nicoloso, S., Czech, M.P., et al. (2011). Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* 123, 186–194.
- Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256.
- Giralt, M., Gavaldà-Navarro, A., and Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 418, 66–73.
- Goetz, R., and Mohammadi, M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 166–180.
- Goetz, R., Beenken, A., Ibrahim, O.A., Kalinina, J., Olsen, S.K., Eliseenkova, A. V., Xu, C., Neubert, T.A., Zhang, F., Linhardt, R.J., et al. (2007). Molecular Insights into the Klotho-Dependent, Endocrine Mode of Action of Fibroblast Growth Factor 19 Subfamily Members. *Mol Cell Biol* 27, 3417–3428.
- Gómez-Lechón, M.J. (1999). Oncostatin M: Signal transduction and biological activity. *Life Sci* 65, 2019–2030.
- González, A., Fortuño, M.A., Querejeta, R., Ravassa, S., López, B., López, N., and Díez, J. (2003). Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 59, 549–562.
- González, A., Ravassa, S., López, B., Moreno, M.U., Beaumont, J., San José, G., Querejeta, R., Bayés-Genís, A., and Díez, J. (2018). Myocardial remodeling in hypertension toward a new view of hypertensive heart disease. *Hypertension* 72, 549–558.
- González, N., Moreno-Villegas, Z., González-Bris, A., Egido, J., and Lorenzo (2017). Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity

and diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 16, 1–11.

Gospodarowicz, D. (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249, 123–127.

Grant, S.L., and Begley, C.G. (1999). The oncostatin M signalling pathway: Reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 5, 406–412.

Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., and Alexander, R.W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74, 1141–1148.

Grossman, W., Jones, D., and McLaurin, L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56–64.

Grove, R.I., Mazzucco, C.E., Radka, S.F., Shoyab, M., and Kiener, P.A. (1991). Oncostatin M up-regulates low density lipoprotein receptors in HepG2 cells by a novel mechanism. *J Biol Chem* 266, 18194–18199.

Guglielmi, V., and Sbraccia, P. (2018). Obesity phenotypes: Depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eat Weight Disord* 23, 3–14.

Gustafson, B., and Smith, U. (2015). Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 241, 27–35.

Gutkind, J.S. (1998a). Cell growth control by G protein-coupled receptors: From signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17, 1331–1342.

Gutkind, J.S. (1998b). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 273, 1839–1842.

Guzzo-Merello, G., Cobo-Marcos, M., Gallego-Delgado, M., and Garcia-Pavia, P. (2014). Alcoholic cardiomyopathy. *World J Cardiol* 6, 771–781.

Haq, S., Choukroun, G., Lim, H., Tymitz, K.M., Monte, F., Gwathmey, J., Grazette, L., Michael, A., Hajjar, R., Force, T., et al. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103, 670–677.

Harris, I.S., Zhang, S., Treskov, I., Kovacs, A., Weinheimer, C., and Muslin, A.J. (2004). Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* 110, 718–723.

Harvey, P.A., and Leinwand, L.A. (2011). Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol* 194, 355–365.

Harwani, S. (2018). Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Transl Res* 191, 45–63.

He, J.L., Zhao, M., Xia, J.J., Guan, J., Liu, Y., Wang, L.Q., Song, D.X., Qu, M.Y., Zuo, M., Wen, X., et al. (2016). FGF21 ameliorates the neurocontrol of blood pressure in the high fructose-drinking rats. *Sci Rep* 6, 1–11.

Heineke, J., and Molkenin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589–600.

- Henkel, J., Gärtner, D., Dorn, C., Hellerbrand, C., Schanze, N., Elz, S.R., and Püschel, G.P. (2011). Oncostatin M produced in Kupffer cells in response to PGE₂: Possible contributor to hepatic insulin resistance and steatosis. *Lab Invest* *91*, 1107–1117.
- Hermanns, H.M. (2015). Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* *26*, 545–558.
- Heymans, S., Lupu, F., Terclavers, S., Vanwetswinkel, B., Herbert, J., Baker, A., Collen, D., Carmeliet, P., and Moons, L. (2005). Loss or Inhibition of uPA or MMP-9 Attenuates LV Remodeling and Dysfunction after Acute Pressure Overload in Mice. *Am J Pathol* *166*, 15–25.
- Hibbs, R.G., Ferrans, V.J., Black, W.C., Weilbaecher, D.G., Walsh, J.J., and Burch, G.E. (1965). Alcoholic cardiomyopathy. An electron microscopic study. *Am Heart J* *69*, 766–779.
- Hinderer, S., and Schenke-Layland, K. (2019). Cardiac fibrosis – A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev* *146*, 77–82.
- Hoek, J.B., Cahill, A., and Pastorino, J.G. (2002). Alcohol and mitochondria: A dysfunctional relationship. *Gastroenterology* *122*, 2049–2063.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* *286*, 12983–12990.
- Hu, C., Ge, F., Hyodo, E., Arai, K., Iwata, S., Lobdell, H., Walewski, J.L., Zhou, S., Clugston, R.D., Jiang, H., et al. (2013). Chronic ethanol consumption increases cardiomyocyte fatty acid uptake and decreases ventricular contractile function in C57BL/6J mice. *J Mol Cell Cardiol* *59*, 30–40.
- Huang, J., Ishino, T., Chen, G., Rolzin, P., Osothprarop, T.F., Retting, K., Li, L., Jin, P., Matin, M.J., Huyghe, B., et al. (2013). Development of a Novel Long-Acting Antidiabetic FGF21 Mimetic by Targeted Conjugation to a Scaffold Antibody. *J Pharmacol Exp Ther* *346*, 270–280.
- Huang, Z., Xu, A., and Cheung, B.M.Y. (2017). The Potential Role of Fibroblast Growth Factor 21 in Lipid Metabolism and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* *19*, 17–22.
- Hui, S.C.N., Wong, S.K.H., Ai, Q., Yeung, D.K.W., Ng, E.K.W., and Chu, W.C.W. (2019). Observed changes in brown, white, hepatic and pancreatic fat after bariatric surgery: Evaluation with MRI. *Eur Radiol* *29*, 849–856.
- Hunter, J.J., and Chien, K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* *341*, 1276–1283.
- Iacobellis, G., and Bianco, A.C. (2011). Epicardial adipose tissue: Emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol Metab* *22*, 450–457.
- Iacobellis, G., Ribaud, M.C., Leto, G., Zappaterreno, A., Vecci, E., Di Mario, U., and Leonetti, F. (2002). Influence of excess fat on cardiac morphology and function: Study in uncomplicated obesity. *Obes Res* *10*, 767–773.
- Itoh, N. (2010). Hormone-like (endocrine) Fgfs: Their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* *342*, 1–11.
- Itoh, N. (2014). FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* *5*, 4–7.

- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20, 563–569.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn* 237, 18–27.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2011). Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 149, 121–130.
- Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitononkov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 582, 3805–3810.
- Jafri, M.S., Dudycha, S.J., and Rourke, B.O. (2001). CARDIAC ENERGY METABOLISM : Models of Cellular Respiration. *Annu Rev Biomed Eng* 3, 57–81.
- Jankala, H. (2000). Role of Acetaldehyde in the Induction of Heart Left Ventricular Atrial Natriuretic Peptide Gene Expression in Rats. *Alcohol Alcohol* 35, 331–335.
- Jing, L., Zhou, L. jun, Li, W. min, Zhang, F. min, Yuan, L., Li, S., Song, J., and Sang, Y. (2011). Carnitine regulates myocardial metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) in alcoholic cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 17, 1–9.
- Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L.T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol* 11, 4627–4634.
- Jørgensen, J.R., Fransson, A., Fjord-Larsen, L., Thompson, L.H., Houchins, J.P., Andrade, N., Torp, M., Kalkkinen, N., Andersson, E., Lindvall, O., et al. (2012). Cometin is a novel neurotrophic factor that promotes neurite outgrowth and neuroblast migration in vitro and supports survival of spiral ganglion neurons in vivo. *Exp Neurol* 233, 172–181.
- Jung, T.W., Lee, S.H., Kim, H.C., Bang, J.S., Abd El-Aty, A.M., Hacımüftüoğlu, A., Shin, Y.K., and Jeong, J.H. (2018). METRNL attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance via AMPK or PPAR δ -dependent pathways in skeletal muscle of mice. *Exp Mol Med* 50.
- Kasner, M., Westermann, D., Lopez, B., Gaub, R., Escher, F., Kühl, U., Schultheiss, H.P., and Tschpe, C. (2011). Diastolic tissue doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 57, 977–985.
- Kharitononkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115, 1627–1635.
- Kharitononkov, A., Wroblewski, V.J., Koester, A., Chen, Y.F., Clutinger, C.K., Tigno, X.T., Hansen, B.C., Shanafelt, A.B., and Etgen, G.J. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 148, 774–781.
- Kharitononkov, A., Beals, J.M., Micanovic, R., Strifler, B.A., Rathnachalam, R., Wroblewski, V.J., Li, S., Koester, A., Ford, A.M., Coskun, T., et al. (2013). Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Candidate, LY2405319. *PLoS One* 8.
- Kim, A.M., Somayaji, V.R., Dong, J.Q., Rolph, T.P., Weng, Y., Chabot, J.R., Gropp, K.E., Talukdar, S.,

- and Calle, R.A. (2017). Once-weekly administration of a long-acting fibroblast growth factor 21 analogue modulates lipids, bone turnover markers, blood pressure and body weight differently in obese people with hypertriglyceridaemia and in non-human primates. *Diabetes, Obes Metab* 19, 1762–1772.
- Kim, W.J., Kim, S.S., Lee, H.C., Song, S.H., Bae, M.J., Yi, Y.S., Jeon, Y.K., Kim, B.H., Kim, Y.K., and Kim, I.J. (2015). Association between serum fibroblast growth factor 21 and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci* 30, 586–590.
- Kissler, H.J., and Settmacher, U. (2013). Bariatric Surgery to Treat Obesity. *Semin Nephrol* 33, 75–89.
- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., and Nathan, D.M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346, 393–403.
- Kolwicz, S.C., Purohit, S., and Tian, R. (2013). Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* 113, 603–616.
- Komori, T., Tanaka, M., Senba, E., Miyajima, A., and Morikawa, Y. (2013). Lack of oncostatin M receptor β leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J Biol Chem* 288, 21861–21875.
- Komori, T., Tanaka, M., Senba, E., Miyajima, A., and Morikawa, Y. (2014). Deficiency of oncostatin M receptor β (OSMR β) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J Biol Chem* 289, 13821–13837.
- Komori, T., Tanaka, M., Furuta, H., Akamizu, T., Miyajima, A., and Morikawa, Y. (2015). Oncostatin M is a potential agent for the treatment of obesity and related metabolic disorders: a study in mice. *Diabetologia* 58, 1868–1876.
- Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N.G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. 549–574.
- Kuro-o, M. (2008). Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol Metab* 19, 239–245.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Klierer, S.A., and Kuro-O, M. (2007). Tissue-specific expression of β klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 282, 26687–26695.
- Kuwabara, Y., Horie, T., Baba, O., Watanabe, S., Nishiga, M., Usami, S., Izuhara, M., Nakao, T., Nishino, T., Otsu, K., et al. (2015). MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. *Circ Res* 116, 279–288.
- Landmesser, U., Cai, H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo, H., Holland, S.M., and Harrison, D.G. (2002). Role of p47phox in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40, 511–515.
- Lange, L.G., and Sobel, B.E. (1983). Myocardial metabolites of ethanol. *Circ Res* 52, 479–482.
- Laurent, D., and Edwards, J.G. (2014). Alcoholic Cardiomyopathy: Multigenic Changes Underlie

Cardiovascular Dysfunction. *J Cardiol Clin Res* 2, 1–14.

Lavie, C.J., De Schutter, A., Parto, P., Jahangir, E., Kokkinos, P., Ortega, F.B., Arena, R., and Milani, R. V. (2016). Obesity and Prevalence of Cardiovascular Diseases and Prognosis-The Obesity Paradox Updated. *Prog Cardiovasc Dis* 58, 537–547.

Lee, J.H., Kang, Y.E., Kim, J.M., Choung, S., Joung, K.H., Kim, H.J., and Ku, B.J. (2018). Serum Meteorin-like protein levels decreased in patients newly diagnosed with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 135, 7–10.

Lee, S.A., Jeong, E., Kim, E.H., Shin, M.S., Hwang, J.Y., Koh, E.H., Lee, W.J., Park, J.Y., and Kim, M.S. (2012). Various oscillation patterns of serum fibroblast growth factor 21 concentrations in healthy volunteers. *Diabetes Metab J* 36, 29–36.

Lehtonen, J.M., Forsström, S., Bottani, E., Viscomi, C., Baris, O.R., Isoniemi, H., Höckerstedt, K., Österlund, P., Hurme, M., Jylhävä, J., et al. (2016). FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology* 87, 2290–2299.

Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: Muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3, 0672–0687.

Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., and Castelli, W.P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *N Engl J Med* 322, 1561–1566.

Li, F., Li, Y., Duan, Y., Hu, C.A.A., Tang, Y., and Yin, Y. (2017). Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue. *Cytokine Growth Factor Rev* 33, 73–82.

Li, H., Fang, Q., Gao, F., Fan, J., Zhou, J., Wang, X., Zhang, H., Pan, X., Bao, Y., Xiang, K., et al. (2010). Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *J Hepatol* 53, 934–940.

Li, L., Zhao, Q., and Kong, W. (2018). Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol* 68–69, 490–506.

Li, S., Zhang, L., Ni, R., Cao, T., Zheng, D., Xiong, S., Peter, A., Fan, G., and Peng, T. (2016). Disruption of calpain reduces lipotoxicity-induced cardiac injury by preventing endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta* 1862, 2023–2033.

Li, S., Zhu, Z., Xue, M., Yi, X., Liang, J., Niu, C., Chen, G., Shen, Y., Zhang, H., Zheng, J., et al. (2019). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via SIRT1. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1865, 1241–1252.

Li, Z.Y., Zheng, S.L., Wang, P., Xu, T.Y., Guan, Y.F., Zhang, Y.J., and Miao, C.Y. (2014). Subfatin is a Novel Adipokine and Unlike Meteorin in Adipose and Brain Expression. *CNS Neurosci Ther* 20, 344–354.

Li, Z.Y., Song, J., Zheng, S.L., Fan, M.B., Guan, Y.F., Qu, Y., Xu, J., Wang, P., and Miao, C.Y. (2015). Adipocyte metrnl antagonizes insulin resistance through pparg signaling. *Diabetes* 64, 4011–4022.

- Lichtenbelt, W.D.V.M., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med* *360*, 1500–1508.
- Lijnen, P., Papparella, I., Petrov, V., Semplicini, A., and Fagard, R. (2006). Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. *J Hypertens* *24*, 757–766.
- Lin, Z., Wu, Z., Yin, X., Liu, Y., Yan, X., Lin, S., Xiao, J., Wang, X., Feng, W., and Li, X. (2010). Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PLoS One* *5*, 4–9.
- Lin, Z., Pan, X., Wu, F., Ye, D., Zhang, Y., Wang, Y., Jin, L., Lian, Q., Huang, Y., Ding, H., et al. (2015). Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice. *Circulation* *131*, 1861–1871.
- Linsley, P.S., Kallestad, J., Ochs, V., and Neubauer, M. (1990). Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. *Mol Cell Biol* *10*, 1882–1890.
- Liu, J., Fox, C.S., Hickson, D.M.A., May, W.D., Hairston, K.G., Carr, J.J., and Taylor, H.A. (2010). Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: The Jackson Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* *95*, 5419–5426.
- Liu, S.Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S.M., Li, Y.C., Zhang, L.Q., and Wu, Y.H. (2013). Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci Rep* *3*.
- Liu, Y., Zhao, C., Xiao, J., Liu, L., Zhang, M., Wang, C., Wu, G., Zheng, M.H., Xu, L.M., Chen, Y.P., et al. (2016). Fibroblast growth factor 21 deficiency exacerbates chronic alcohol-induced hepatic steatosis and injury. *Sci Rep* *6*, 1–13.
- Liu, Z.X., Ji, H.H., Yao, M.P., Wang, L., Wang, Y., Zhou, P., Liu, Y., Zheng, X.F., He, H.W., Wang, L.S., et al. (2019). Serum Metrnl is associated with the presence and severity of coronary artery disease. *J Cell Mol Med* *23*, 271–280.
- Löffler, D., Landgraf, K., Rockstroh, D., Schwartz, J.T., Dunzendorfer, H., Kiess, W., and Körner, A. (2017). METRNL decreases during adipogenesis and inhibits adipocyte differentiation leading to adipocyte hypertrophy in humans. *Int J Obes* *41*, 112–119.
- Lopaschuk, G.D., Spafford, M.A., and Marsh, D.R. (1991). Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* *261*, 1698–1705.
- López, B., Ravassa, S., González, A., Zubillaga, E., Bonavilla, C., Bergés, M., Echegaray, K., Beaumont, J., Moreno, M.U., San José, G., et al. (2016). Myocardial collagen cross-linking is associated with heart failure hospitalization in patients with hypertensive heart failure. *J Am Coll Cardiol* *67*, 251–260.
- Ludgero-Correia, A., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., and Faria, T.S. (2012). Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition* *28*, 316–323.
- Luo, L., and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* *231*, R77–R99.

- Luo, P., Wang, P.X., Li, Z.Z., Zhang, X.J., Jiang, X., Gong, J., Qin, J.J., Guo, J., Zhu, X., Yang, S., et al. (2016). Hepatic Oncostatin M Receptor β Regulates Obesity-Induced Steatosis and Insulin Resistance. *Am J Pathol* 186, 1278–1292.
- Lynch, T.L., Sivaguru, M., Velayutham, M., Cardounel, A.J., Michels, M., Barefield, D., Govindan, S., Remedios, C. Dos, Van Der Velden, J., and Sadayappan, S. (2015). Oxidative Stress in Dilated Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Mutation. *Oxid Med Cell Longev* 2015.
- Ma, H., Byra, E.A., Yu, L., Hu, N., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T., and Ren, J. (2010). Aldehyde dehydrogenase 2 knock out accentuates ethanol-induced cardiac depression : Role of protein phosphatases. *J Mol Cell Cardiol* 49, 322–329.
- Ma, Y., Streiff, R., Liu, J., Spence, M., and Vestal, R. (1999). Cloning and characterization of human oncostatin M promoter. *Nucleic Acids Res* 27, 4649–4657.
- Ma, Z.G., Yuan, Y.P., Wu, H.M., Zhang, X., and Tang, Q.Z. (2018). Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci* 14, 1645–1657.
- Maddaluno, L., Urwyler, C., and Werner, S. (2017). Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development* 144, 4047–4060.
- Maillet, M., Berlo, J.H. Van, and Molkentin, J.D. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell* 14, 38–48.
- Malik, N., Kallestad, J.C., Gunderson, N.L., Austin, S.D., Neubauer, M.G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J.M., Shoyab, M., and Wei, C.M. (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9, 2847–2853.
- Maratos-Flier, E. (2017). Fatty liver and FGF21 physiology. *Exp Cell Res* 360, 2–5.
- Marín-Royo, G., Ortega-Hernández, A., Martínez-Martínez, E., Jurado-López, R., Luaces, M., Islas, F., Gómez-Garre, D., Delgado-Valero, B., Lagunas, E., Ramchandani, B., et al. (2019). The Impact of Cardiac Lipotoxicity on Cardiac Function and Mirnas Signature in Obese and Non-Obese Rats with Myocardial Infarction. *Sci Rep* 9, 1–11.
- Mason, I. (2007). Initiation to end point: The multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat Rev Neurosci* 8, 583–596.
- Matsumoto, E., Sasaki, S., Kinoshita, H., Kito, T., Ohta, H., Konishi, M., Kuwahara, K., Nakao, K., and Itoh, N. (2013). Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16. *Genes to Cells* 18, 544–553.
- Matsusaka, H., Ide, T., Matsushima, S., Ikeuchi, M., Kubota, T., Sunagawa, K., Kinugawa, S., and Tsutsui, H. (2006). Targeted Deletion of Matrix Metalloproteinase 2 Ameliorates Myocardial Remodeling in Mice With Chronic Pressure Overload. 0–6.
- Matyas, C., Varga, Z. V., Mukhopadhyay, P., Paloczi, J., Lajtos, T., Erdelyi, K., Nemeth, B.T., Nan, M., Hasko, G., Gao, B., et al. (2016). Chronic plus binge ethanol feeding induces myocardial oxidative stress, mitochondrial and cardiovascular dysfunction, and steatosis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 310, H1658–H1670.
- Min, S.Y., Kady, J., Nam, M., Rojas-Rodriguez, R., Berkenwald, A., Kim, J.H., Noh, H.L., Kim, J.K., Cooper, M.P., Fitzgibbons, T., et al. (2016). Human “brite/beige” adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med* 22,

312–318.

Mirijello, A., Tarli, C., Vassallo, G.A., Sestito, L., Antonelli, M., d'Angelo, C., Ferrulli, A., De Cosmo, S., Gasbarrini, A., and Addolorato, G. (2017). Alcoholic cardiomyopathy: What is known and what is not known. *Eur J Intern Med* 43, 1–5.

Moertl, D., Berger, R., Struck, J., Gleiss, A., Hammer, A., Morgenthaler, N.G., Bergmann, A., Huelsmann, M., and Pacher, R. (2009). Comparison of Midregional Pro-Atrial and B-Type Natriuretic Peptides in Chronic Heart Failure. Influencing Factors, Detection of Left Ventricular Systolic Dysfunction, and Prediction of Death. *J Am Coll Cardiol* 53, 1783–1790.

Moreno, M.U., Eiros, R., Gavira, J.J., Gallego, C., González, A., Ravassa, S., López, B., Beaumont, J., San José, G., and Díez, J. (2017). The Hypertensive Myocardium: From Microscopic Lesions to Clinical Complications and Outcomes. *Med Clin North Am* 101, 43–52.

Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L.S., and Cosman, D. (1996). Dual Oncostatin M (OSM) Receptors. *J Biol Chem* 271, 32635–32643.

Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J.R., Berger, J.P., and Wong, K.K. (2008). Adipose Fibroblast Growth Factor 21 Is Up-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and Altered Metabolic States. *Mol Pharmacol* 74, 403–412.

Murdolo, G., Angeli, F., Reboldi, G., Di Giacomo, L., Aita, A., Bartolini, C., and Vedecchia, P. (2015). Left Ventricular Hypertrophy and Obesity: Only a Matter of Fat? *High Blood Press Cardiovasc Prev* 22, 29–41.

Nedergaard, J. (2014). Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance. 277–359.

Neubauer, S. (2007). The failing heart - An engine out of fuel. *N Engl J Med* 356, 1140–1151.

Neylan, C.J., Kannan, U., Dempsey, D.T., Williams, N.N., and Dumon, K.R. (2016). The Surgical Management of Obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 45, 689–703.

Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1492, 203–206.

Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., and Kuro-o, M. (2007). BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7432–7437.

Ohtsu, H., Frank, G.D., Utsunomiya, H., and Eguchi, S. (2005). Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: Mechanistic insights and its pathophysiology. *Antioxidants Redox Signal* 7, 1315–1326.

Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Satake, M., Kim, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Takemura, M., Fujimoto, J., Terada, N., et al. (2005). Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 166, 709–719.

Oparil, S., and Schmieder, R.E. (2015). New Approaches in the Treatment of Hypertension. *Circ Res* 116, 1074–1095.

Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. Wiley

Interdiscip Rev Dev Biol 215–266.

Ottobelli Chielle, E., de Souza, W.M., da Silva, T.P., Moresco, R.N., and Moretto, M.B. (2016). Adipocytokines, inflammatory and oxidative stress markers of clinical relevance altered in young overweight/obese subjects. *Clin Biochem* 49, 548–553.

Oudit, G.Y., Crackower, M.A., Eriksson, U., Sarao, R., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V.O., Wada, T., et al. (2003). Phosphoinositide 3-Kinase γ -Deficient Mice Are Protected From Isoproterenol-Induced Heart Failure. *Circulation* 108, 2147–2152.

Oulion, S., Bertrand, S., and Escriva, H. (2012). Evolution of the FGF Gene Family. *Int J Evol Biol* 2012, 1–12.

Pan, X., Shao, Y., Wu, F., Wang, Y., Xiong, R., Zheng, J., Tian, H., Wang, B., Wang, Y., Zhang, Y., et al. (2018). FGF21 Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction by Activation of ACE2/Angiotensin-(1–7) Axis in Mice. *Cell Metab* 27, 1323–1337.e5.

Parra, D., and Hough, A. (2014). Current therapeutic approaches to cardio-protection in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 16.

Parto, P., and Lavie, C.J. (2017). Obesity and Cardiovascular Diseases. *Curr Probl Cardiol* 42, 376–394.

Patel, V., Adya, R., Chen, J., Ramanjaneya, M., Bari, M.F., Bhudia, S.K., Hillhouse, E.W., Tan, B.K., and Randeve, H.S. (2014). Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One* 9.

Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., et al. (2004). PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375–387.

Pi-Sunyer, X., Blackburn, G., Brancati, F., Bray, G., Bright, R., Clark, J., Curtis, J., and Espeland, M. (2007). Reduction in Weight and Cardiovascular Disease Risk Factors in Individuals With Type 2 Diabetes: One-Year Results of the Look AHEAD Trial. *Diabetes Care* 30, 1374–1383.

Piano, M.R. (2017). Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res* 38, 219–241.

Piano, M.R., and Phillips, S.A. (2014). Alcoholic cardiomyopathy: Pathophysiologic insights. *Cardiovasc Toxicol* 14, 291–308.

Piché, M.E., Poirier, P., Lemieux, I., and Després, J.P. (2018). Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Prog Cardiovasc Dis* 61, 103–113.

Piquer-Garcia, I., Campderros, L., Taxerås, S.D., Gavaldà-Navarro, A., Pardo, R., Vila, M., Pellitero, S., Martínez, E., Tarascó, J., Moreno, P., et al. (2019). A role for Oncostatin M in the impairment of glucose homeostasis in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*.

Planavila, A., Calvo, R., and Vazquez-Carrera, M. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Control of Fatty Acid Oxidation in Cardiac Hypertrophy. *Mini-Reviews Med Chem* 6, 357–363.

Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., Bilsen, M. Van, et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against

cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* 4, 1–12.

Planavila, A., Redondo-Angulo, I., and Villarroya, F. (2015a). FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 1–7.

Planavila, A., Redondo-angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralte, M., and Villarroya, F. (2015b). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *1*, 19–31.

Planavila, A., Fernández-Solà, J., and Villarroya, F. (2017). Cardiokines as Modulators of Stress-Induced Cardiac Disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol* 108, 227–256.

Poitou, C., Perret, C., Mathieu, F., Truong, V., Blum, Y., Durand, H., Alili, R., Chelghoum, N., Pelloux, V., Aron-Wisnewsky, J., et al. (2015). Bariatric surgery induces disruption in inflammatory signaling pathways mediated by immune cells in adipose tissue: A RNA-seq study. *PLoS One* 10, 1–23.

Popovici, C., Roubin, R., Coulier, F., and Birnbaum, D. (2005). An evolutionary history of the FGF superfamily. *BioEssays* 27, 849–857.

Porta, R., Borea, R., Coelho, A., Khan, S., Araújo, A., Reclusa, P., Franchina, T., Van Der Steen, N., Van Dam, P., Ferri, J., et al. (2017). FGFR a promising druggable target in cancer: Molecular biology and new drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* 113, 256–267.

Porter, K.E., and Turner, N.A. (2009). Cardiac fibroblasts : At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123, 255–278.

Posch, M.G., Perrot, A., Berger, F., and Ozcelik, C. (2010). Molecular genetics of congenital atrial septal defects. *Clin Res Cardiol* 99, 137–147.

Poulter, N.R., Prabhakaran, D., and Caulfield, M. (2015). Hypertension. *Lancet (London, England)* 386, 801–812.

Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78–90.

Purcell, N.H., Wilkins, B.J., York, A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., Robbins, J., and Molkenin, J.D. (2007). Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14074–14079.

Rababa'h, A.M., Guillory, A.N., Mustafa, R., and Hijjawi, T. (2018). Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge. *Curr Cardiol Rev* 14, 53–59.

Rachid, B., Van De Sande-Lee, S., Rodovalho, S., Folli, F., Beltramini, G.C., Morari, J., Amorim, B.J., Pedro, T., Ramalho, A.F., Bombassaro, B., et al. (2015). Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity. *Int J Obes* 39, 1515–1522.

Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K., and Harrison, D.G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97, 1916–1923.

Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L.,

- Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 157, 1279–1291.
- Ravassa, S., González, A., López, B., Querejeta, R., Larman, M., and Díez, J. (2007). Upregulation of myocardial Annexin A5 in hypertensive heart disease: association with systolic dysfunction. *Eur Heart J* 28, 2148–2157.
- Reaven, G.M. (2011). Insulin Resistance: The Link Between Obesity and Cardiovascular Disease. *Med Clin North Am* 95, 875–892.
- Refsgaard Holm, M., Christensen, H., Rasmussen, J., Johansen, M.L., Schou, M., Faber, J., and Kistorp, C. (2019). Fibroblast growth factor 21 in patients with cardiac cachexia: a possible role of chronic inflammation. *ESC Hear Fail* 21, 983–991.
- Regan, T.J., Levinson, G.E., Oldewurtel, H.A., Frank, M.J., Weisse, A.B., and Moschos, C.B. (1969). Ventricular function in noncardiacs with alcoholic fatty liver: role of ethanol in the production of cardiomyopathy. *J Clin Invest* 48, 397–407.
- Rehm, J., and Roerecke, M. (2017). Cardiovascular effects of alcohol consumption. *Trends Cardiovasc Med* 27, 534–538.
- Rehm, J., Taylor, B., Mohapatra, S., Irving, H., Baliunas, D., Patra, J., and Roerecke, M. (2010). Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev* 29, 437–445.
- Ribas, F., Villarroya, J., Hondares, E., Giralt, M., and Villarroya, F. (2014). FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochem J* 463, 191–199.
- Richards, C.D. (2013). The Enigmatic Cytokine Oncostatin M and Roles in Disease. *ISRN Inflamm* 2013, 1–23.
- Ritter, O., and Neyses, L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med* 9, 313–321.
- Roman, B.B., Geenen, D.L., Leitges, M., and Buttrick, P.M. (2001). PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 280, 2264–2270.
- Rose, T.M., Lagrou, M.J., Fransson, I., Werelius, B., Delattre, O., Thomas, G., de Jong, P.J., Todaro, G.J., and Dumanski, J.P. (1993). The genes for oncostatin m (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22. *Genomics* 17, 136–140.
- Rosenkranz, S., Flesch, M., Amann, K., Haeuseler, C., Kilter, H., Seeland, U., Schlüter, K.D., and Böhm, M. (2002). Alterations of β -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β 1. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 283, 1253–1262.
- Ruan, C.C., Kong, L.R., Chen, X.H., Ma, Y., Pan, X.X., Zhang, Z.B., and Gao, P.J. (2018). A2A Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21. *Cell Metab* 28, 476-489.e5.
- Rubattu, S., Pagliaro, B., Pierelli, G., Santolamazza, C., Di Castro, S., Mennuni, S., and Volpe, M. (2015). Pathogenesis of target organ damage in hypertension: Role of mitochondrial oxidative stress. *Int J Mol Sci* 16, 823–839.

- Rupérez, C., Lerin, C., Ferrer-Curriu, G., Cairo, M., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., Villarroya, J., Giralt, M., Villarroya, F., and Planavila, A. (2018). Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 260, 163–170.
- Rupp, H. (1981). The adaptive changes in the isoenzyme pattern of myosin from hypertrophied rat myocardium as a result of pressure overload and physical training. *Basic Res Cardiol* 76, 79–88.
- Russell, L.K., Mansfield, C.M., Lehman, J.J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., Valencik, M.L., McDonald, J.A., and Kelly, D.P. (2004). Cardiac-Specific Induction of the Transcriptional Coactivator Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α Promotes Mitochondrial Biogenesis and Reversible Cardiomyopathy in a Developmental Stage-Dependent Manner. *Circ Res* 94, 525–533.
- Sacks, H.S., Fain, J.N., Holman, B., Cheema, P., Chary, A., Parks, F., Karas, J., Optican, R., Bahouth, S.W., Garrett, E., et al. (2009). Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: Epicardial fat functioning as brown fat. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 3611–3615.
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zeriouh, M., Schmack, B., Farag, M., Popov, A.F., Dohmen, P.M., Choi, Y.H., Wahlers, T., et al. (2016). Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res* 22, 75–79.
- Sanchez-Infantes, D., White, U.A., Elks, C.M., Morrison, R.F., Gimble, J.M., Considine, R. V., Ferrante, A.W., Ravussin, E., and Stephens, J.M. (2014). Oncostatin M is produced in adipose tissue and is regulated in conditions of obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 99, 1–9.
- Sánchez-Infantes, D., Cereijo, R., Peyrou, M., Piquer-Garcia, I., Stephens, J.M., and Villarroya, F. (2017). Oncostatin m impairs brown adipose tissue thermogenic function and the browning of subcutaneous white adipose tissue. *Obesity* 25, 85–93.
- Santos, M., and Shah, A.M. (2014). Alterations in cardiac structure and function in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 16, 1–18.
- Sarruf, D.A., Thaler, J.P., Morton, G.J., German, J., Fischer, J.D., Ogimoto, K., and Schwartz, M.W. (2010). Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 59, 1817–1824.
- Savoia, C., Volpe, M., Alonzo, A., Rossi, C., and Rubattu, S. (2010). Natriuretic peptides and cardiovascular damage in the metabolic syndrome: Molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci* 118, 231–240.
- Schauer, P.R., Bhatt, D.L., Kirwan, J.P., Wolski, K., Aminian, A., Brethauer, S.A., Navaneethan, S.D., Singh, R.P., Pothier, C.E., Nissen, S.E., et al. (2017). Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes - 5-year outcomes. *N Engl J Med* 376, 641–651.
- Schlottmann, F., Galvarini, M.M., Dreifuss, N.H., Laxague, F., Buxhoeveden, R., and Gorodner, V. (2018). Metabolic Effects of Bariatric Surgery. *J Laparoendosc Adv Surg Tech* 28, 944–948.
- Schoettl, T., Fischer, I.P., and Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol* 121.

- Schumann, G., Liu, C., O'Reilly, P., Gao, H., Song, P., Xu, B., Ruggeri, B., Amin, N., Jia, T., Preis, S., et al. (2016). KLB is associated with alcohol drinking, and its gene product β -Klotho is necessary for FGF21 regulation of alcohol preference. *Proc Natl Acad Sci* *113*, 14372–14377.
- Semba, R.D., Crasto, C., Strait, J., Sun, K., Schaumberg, D.A., and Ferrucci, L. (2013). Elevated serum fibroblast growth factor 21 is associated with hypertension in community-dwelling adults. *J Hum Hypertens* *27*, 397–399.
- Shareef, M.A., Anwer, L.A., and Poizat, C. (2014). Cardiac SERCA2A/B: Therapeutic targets for heart failure. *Eur J Pharmacol* *724*, 1–8.
- Shen, Y., Ma, X., Zhou, J., Pan, X., Hao, Y., Zhou, M., Lu, Z., Gao, M., Bao, Y., and Jia, W. (2013). Additive relationship between serum fibroblast growth factor 21 level and coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol* *12*, 1.
- Shield, K.D., Parry, C., and Rehm, J. (2014). Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res Curr Rev* *35*, 155–171.
- Shimizu, I., and Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* *97*, 245–262.
- Sjo, L., Sjo, C.D., and Lo, H. (2019). Bariatric Surgery and Long-term Cardiovascular Events.
- Smith, R., Duguay, A., Bakker, A., Li, P., Weiszmann, J., Thomas, M.R., Alba, B.M., Wu, X., Gupte, J., Yang, L., et al. (2013). FGF21 Can Be Mimicked In Vitro and In Vivo by a Novel Anti-FGFR1c/ β -Klotho Bispecific Protein. *PLoS One* *8*.
- Søberg, S., Sandholt, C.H., Jespersen, N.Z., Toft, U., Madsen, A.L., von Holstein-Rathlou, S., Grevenkoed, T.J., Christensen, K.B., Bredie, W.L.P., Potthoff, M.J., et al. (2017). FGF21 Is a Sugar-Induced Hormone Associated with Sweet Intake and Preference in Humans. *Cell Metab* *25*, 1045-1053.e6.
- Søberg, S., Andersen, E.S., Dalgaard, N.B., Jarlhelt, I., Hansen, N.L., Hoffmann, N., Vilsbøll, T., Chenchar, A., Jensen, M., Grevenkoed, T.J., et al. (2018). FGF21, a liver hormone that inhibits alcohol intake in mice, increases in human circulation after acute alcohol ingestion and sustained binge drinking at Oktoberfest. *Mol Metab* *11*, 96–103.
- Songbo, M., Lang, H., Xinyong, C., Bin, X., Ping, Z., and Liang, S. (2019). Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* *307*, 41–48.
- Sonoda, J., Chen, M.Z., and Baruch, A. (2017). FGF21-receptor agonists: an emerging therapeutic class for obesity-related diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig* *30*.
- Soteriades, E.S., Targino, M.C., Talias, M.A., Hauser, R., Kawachi, I., Christiani, D.C., and Kales, S.N. (2011). Obesity and risk of LVH and ECG abnormalities in US firefighters. *J Occup Environ Med* *53*, 867–871.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., de Angelis, M.H., and Häring, H.U. (2017). Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men. *Endocr Rev* *38*, 468–488.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* *85*, 1093–1129.
- Steiner, J.L., and Lang, C.H. (2017). Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative

stress and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 89, 125–135.

Stine, R.R., Shapira, S.N., Lim, H.W., Ishibashi, J., Harms, M., Won, K.J., and Seale, P. (2016). EBF2 promotes the recruitment of beige adipocytes in white adipose tissue. *Mol Metab* 5, 57–65.

Sun, M., Jin, L., Bai, Y., Wang, L., Zhao, S., Ma, C., and Ma, D. (2019). Fibroblast growth factor 21 protects against pathological cardiac remodeling by modulating galectin-3 expression. *J Cell Biochem* 19529–19540.

Sunaga, H., Koitabashi, N., Iso, T., Matsui, H., Obokata, M., Kawakami, R., Murakami, M., Yokoyama, T., and Kurabayashi, M. (2019). Activation of cardiac AMPK-FGF21 feed-forward loop in acute myocardial infarction: Role of adrenergic overdrive and lipolysis byproducts. *Sci Rep* 9, 1–13.

Sung, H.K., Doh, K.O., Son, J.E., Park, J.G., Bae, Y., Choi, S., Nelson, S.M.L., Cowling, R., Nagy, K., Michael, I.P., et al. (2013). Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab* 17, 61–72.

Sussman, M.A., Lim, H.W., Gude, N., Taigen, T., Olson, E.N., Robbins, J., Colbert, M.C., Gualberto, A., Wieczorek, D.F., and Molkentin, J.D. (1998). Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* (80-) 281, 1690–1693.

Suzuki, M., Uehara, Y., Motomura-Matsuzaka, K., Oki, J., Koyama, Y., Kimura, M., Asada, M., Komi-Kuramochi, A., Oka, S., and Toru, T. (2008). β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol Endocrinol* 22, 1006–1014.

Sweeting, A.N., and Caterson, I.D. (2017). Approaches to obesity management. *Intern Med J* 47, 734–739.

Talukdar, S., Owen, B.M., Song, P., Hernandez, G., Zhang, Y., Zhou, Y., Scott, W.T., Paratala, B., Turner, T., Smith, A., et al. (2016a). FGF21 regulates sweet and alcohol preference. *Cell Metab* 23, 344–349.

Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., et al. (2016b). A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab* 23, 427–440.

Tan, Y., Li, X., Prabhu, S.D., Brittan, K.R., Chen, Q., Yin, X., McClain, C.J., Zhou, Z., and Cai, L. (2012). Angiotensin II plays a critical role in alcohol-induced cardiac nitrative damage, cell death, remodeling, and cardiomyopathy in a protein kinase C/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent manner. *J Am Coll Cardiol* 59, 1477–1486.

Tanajak, P., Sa-Nguanmoo, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Chattipakorn, S.C., and Chattipakorn, N. (2016). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) therapy attenuates left ventricular dysfunction and metabolic disturbance by improving FGF21 sensitivity, cardiac mitochondrial redox homeostasis and structural changes in pre-diabetic rats. *Acta Physiol* 217, 287–299.

Tanaka, M., Hara, T., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Miyajima, A. (1999). Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: Molecular cloning of the mouse OSM receptor β subunit. *Blood* 93, 804–815.

Tankó, L.B., Bagger, Y.Z., Alexandersen, P., Larsen, P.J., and Christiansen, C. (2003). Central and

- peripheral fat mass have contrasting effect on the progression of aortic calcification in postmenopausal women. *Eur Heart J* 24, 1531–1537.
- Teunissen, B.E.J., Smeets, P.J.H., Willemsen, P.H.M., Windt, L.J. De, Vusse, G.J. Van Der, and Bilsen, M. Van (2007). Activation of PPAR δ inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts. *75*, 519–529.
- Tham, Y.K., Bernardo, B.C., Ooi, J.Y.Y., Weeks, K.L., and McMullen, J.R. (2015). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 89, 1401–1438.
- Tiseo, M., Gelsomino, F., Alfieri, R., Cavazzoni, A., Bozzetti, C., De Giorgi, A.M., Petronini, P.G., and Ardizzoni, A. (2015). FGFR as potential target in the treatment of squamous non small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 41, 527–539.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349–363.
- Toumainen, T., and Tavi, P. (2017). The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Exp Cell Res* 360, 12–18.
- Tremaroli, V., Karlsson, F., Werling, M., Ståhlman, M., Kovatcheva-Datchary, P., Olbers, T., Fändriks, L., Le Roux, C.W., Nielsen, J., and Bäckhed, F. (2015). Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab* 22, 228–238.
- Trowell, O.A., and Willmer, E.N. (1939). Studies on the Growth of Tissues in vitro. *J Exp Biol* 16.
- Tsiplenkova, V.G., Vikhert, A.M., and Cherpachenko, N.M. (1986). Ultrastructural and histochemical observations in human and experimental alcoholic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 8, 22A-32A.
- Ushach, I., Burkhardt, A.M., Martinez, C., Hevezi, P.A., Gerber, P.A., Buhren, B.A., Schruppf, H., Valle-Rios, R., Vazquez, M.I., Homey, B., et al. (2015). METEORIN-LIKE is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages. *Clin Immunol* 156, 119–127.
- Ushach, I., Arrevillaga-Boni, G., Heller, G.N., Pone, E., Hernandez-Ruiz, M., Catalan-Dibene, J., Hevezi, P., and Zlotnik, A. (2018). Meteorin-like/Meteorin- β Is a Novel Immunoregulatory Cytokine Associated with Inflammation. *J Immunol* 201, 3669–3676.
- Vegiopoulos, A., Müller-decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Diaz, M.B., Rozman, J., Angelis, M.H. De, Nüsing, R.M., et al. (2010). Recruitment of Brown Adipocytes. *Science* (80-) 328, 1158–1161.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Altomare, E., Serviddio, G., Portincasa, P., Prigigallo, F., and Palasciano, G. (2001). Mitochondrial oxidative damage and myocardial fibrosis in rats chronically intoxicated with moderate doses of ethanol. *Toxicol Lett* 123, 209–216.
- Véniant, M.M., Komorowski, R., Chen, P., Stanislaus, S., Winters, K., Hager, T., Zhou, L., Wada, R., Hecht, R., and Xu, J. (2012). Long-acting FGF21 has enhanced efficacy in diet-induced obese mice and in obese rhesus monkeys. *Endocrinology* 153, 4192–4203.
- Vijgen, G.H.E.J., Bouvy, N.D., Teule, G.J.J., Brans, B., Hoeks, J., Schrauwen, P., and Van Marken Lichtenbelt, W.D. (2012). Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly

obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 1229–1233.

Vikhert, A.M., Tsiplenkova, V.G., and Cherpachenko, N.M. (1986). Alcoholic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 8, 3A-11A.

Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 13, 26–35.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360, 1518–1525.

Voloshenyuk, T.G., Landesman, E.S., Khoutorova, E., Hart, A.D., and Gardner, J.D. (2011). Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- β 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling. *Cytokine* 55, 90–97.

Van der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C., Stam, H.C.G., and Reneman, R.S. (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 72, 881–940.

Walker, E.C., McGregor, N.E., Poulton, I.J., Solano, M., Pompolo, S., Fernandes, T.J., Constable, M.J., Nicholson, G.C., Zhang, J.G., Nicola, N.A., et al. (2010). Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice mice. *J Clin Invest* 120, 582–592.

Wang, K., Li, F., Wang, C., Deng, Y., Cao, Z., Cui, Y., Xu, K., Lin, P., and Sun, Y. (2019). Serum levels of meteorin-like (Metrnl) are increased in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and are associated with insulin resistance. *Med Sci Monit* 25, 2337–2343.

Wang, S., Hu, H., Lu, M., Sirajuddin, A., Li, J., An, J., Chen, X., Yin, G., Lan, T., Dai, L., et al. (2017). Myocardial extracellular volume fraction quantified by cardiovascular magnetic resonance is increased in hypertension and associated with left ventricular remodeling. *Eur Radiol* 27, 4620–4630.

Wang, W.F., Li, S.M., Ren, G.P., Zheng, W., Lu, Y.J., Yu, Y.H., Xu, W.J., Li, T.H., Zhou, L.H., Liu, Y., et al. (2015). Recombinant murine fibroblast growth factor 21 ameliorates obesity-related inflammation in monosodium glutamate-induced obesity rats. *Endocrine* 49, 119–129.

Weber, K.T., Brilla, C.G., and Janicki, J.S. (1993). Myocardial fibrosis: Functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 27, 341–348.

Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M., Kharitonov, A., Köster, A., Sandusky, G.E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006). Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic β -cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 55, 2470–2478.

Westenbrink, B., Ling, H., Divakaruni, A.S., Gray, C.B.B., Zambon, A.C., Dalton, N.D., Peterson, K.L., Gu, Y., Matkovich, S.J., Murphy, A.N., et al. (2015). Mitochondrial Reprogramming induced by CaMKII δ mediates hypertrophy decompensation. *Circ Res* 116, 28–39.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.

Wu, X., Lü, Y., Fu, K., Wang, S., Zhao, D., Peng, H., Fan, Q., Lü, Y., Xin, M., and Liu, J. (2014). [Impact

of exogenous fibroblast growth factor 21 on atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 42, 126–131.

Yang, H., Feng, A., Lin, S., Yu, L., Lin, X., Yan, X., Lu, X., and Zhang, C. (2018). Fibroblast growth factor-21 prevents diabetic cardiomyopathy via AMPK-mediated antioxidation and lipid-lowering effects in the heart article /13/2 /13/95 /64/60 /96/95. *Cell Death Dis* 9.

Yie, J., Hecht, R., Patel, J., Stevens, J., Wang, W., Hawkins, N., Steavenson, S., Smith, S., Winters, D., Fisher, S., et al. (2009). FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation. *FEBS Lett* 583, 19–24.

Yin, F.C.P., Spurgeon, H.A., and Rakusan, K. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: Application in the aging rat. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 12, 941–947.

Yoshimura, A., Ichihara, M., Kinjyo, I., Moriyama, M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hara, T., and Miyajima, A. (1996). Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 15, 1055–1063.

Yuan, F., Lei, Y., Wang, Q., Esberg, L.B., Huang, Z., Scott, G.I., Li, X., and Ren, J. (2015). Moderate ethanol administration accentuates cardiomyocyte contractile dysfunction and mitochondrial injury in high fat diet-induced obesity. *Toxicol Lett* 233, 267–277.

Zhang, Y., and Ren, J. (2011). ALDH2 in alcoholic heart diseases: Molecular mechanism and clinical implications. *Pharmacol Ther* 132, 86–95.

Zhang, B., Turdi, S., Li, Q., Lopez, F.L., Eason, A.R., Anversa, P., and Ren, J. (2010). Cardiac overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction but not hypertrophy: Roles of Akt, mTOR, GSK3 β , and PTEN. *Free Radic Biol Med* 49, 1238–1253.

Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., Lu, X., Zhou, S., Wang, S., Shao, M., Zhang, F., Cheng, P., et al. (2015a). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway. *Diabetologia* 58, 1937–1948.

Zhang, R.-H., Gao, J.-Y., Guo, H.-T., Scott, G.I., Eason, A.R., Wang, X.-M., and Ren, J. (2013). Inhibition of CYP2E1 attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1832, 128–141.

Zhang, T., Maier, L.S., Dalton, N.D., Miyamoto, S., Ross, J., Bers, D.M., and Brown, J.H. (2003). The δ c isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912–919.

Zhang, X., Hu, Y., Zeng, H., Li, L., Zhao, J., Zhao, J., Liu, F., Bao, Y., and Jia, W. (2015b). Serum fibroblast growth factor 21 levels is associated with lower extremity atherosclerotic disease in Chinese female diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* 14, 1–9.

Zheng, S.L., Li, Z.Y., Song, J., Liu, J.M., and Miao, C.Y. (2016). Metrnl: A secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol Sin* 37, 571–579.

Zhu, S., Ma, L., Wu, Y., Ye, X., Zhang, T., Zhang, Q., Rasoul, L.M., Liu, Y., Guo, M., Zhou, B., et al. (2014a). FGF21 treatment ameliorates alcoholic fatty liver through activation of AMPK-SIRT1 pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 46, 1041–1048.

Zhu, W., Wang, C., Liu, L., Li, Y., Li, X., Cai, J., and Wang, H. (2014b). Effects of fibroblast growth factor 21 on cell damage in vitro and atherosclerosis in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 92, 927–935.

APÈNDIX

Decreased myocardial titin expression in chronic alcoholic cardiomyopathy

Revista: Journal of Cardiovascular Disease and Medicine

PMID: Revista no indexada

Títol: Disminució de l'expressió miocàrdica de titina en la cardiomiopatia alcohòlica

Resum:

Objectius: la cardiomiopatia amb fracció d'ejecció reduïda es desenvolupa de forma dependent a la dosi en un terç d'individus amb un consum crònic d'alcohol elevat. L'alcohol altera els senyals de la transducció cardíaca incloent l'acoblament de l'excitació i contracció dels sarcòmers, causant disfunció diastòlica i sistòlica del ventricle esquerre. La titina és una proteïna dels filaments sarcomèrics implicada en la funció contràctil del cor i que contribueix en la recuperació de l'elasticitat dels miòcits sent un factor clau per omplir el ventricle esquerre durant la diàstole. Hem avaluat si l'expressió de la titina està afectada pel consum crònic d'alcohol en la cardiomiopatia alcohòlica.

Mètodes i resultats: es van analitzar un total de 30 mostres de cor procedents de donants d'òrgans: 20 mostres procedien de pacients amb un consum crònic d'alcohol (10 pacients sense cardiomiopatia i 10 pacients amb cardiomiopatia) i 10 mostres procedien de controls sans. L'avaluació dels pacients comprenia el consum acumulat d'alcohol, una radiografia de tòrax, una ecocardiografia 2-D i una histologia del ventricle esquerre. La cardiomiopatia es va avaluar mitjançant paràmetres funcionals i criteris histològics. L'activitat de la titina es va avaluar a través d'immunohistoquímica i d'expressió gènica en el miocardi.

En les immunohistoquímiques, es va detectar una clara expressió de titina en les zones sarcomèriques dels miòcits. En comparació amb els donants sans ($82,58 \pm 3,36$), el conjunt de pacients amb un consum d'alcohol van mostrar una expressió de titina cardíaca significativament inferior ($71,29 \pm 3,16$; disminució de $13,67 \pm 3,83\%$; $p = 0,04$). Tot i això aquesta disminució va ser significativament inferior en els pacients consumidors d'alcohol amb cardiomiopatia ($62,31 \pm 4,18$; disminució del $24,54 \pm 5,06\%$, $p < 0,0009$) en comparació amb els pacients consumidors d'alcohol sense cardiomiopatia ($80,27 \pm 2,62$; disminució del $2,80 \pm 3,17\%$ respecte dels controls; $p < 0,0030$ vs. cardiomiopatia alcohòlica). Els nivells d'expressió gènica de la titina miocàrdica van mostrar el mateix perfil que l'expressió proteica.

Conclusions: el consum crònic d'alcohol disminueix l'expressió de la titina miocàrdica, sobretot quan s'ha desenvolupat cardiomiopatia. La titina està involucrada en el procés patogènic i multifactorial de la cardiomiopatia alcohòlica.

Decreased Myocardial Titin Expression in Chronic Alcoholic Cardiomyopathy

Fernández-Solà Joaquim^{1*}
Toll-Argudo Marta²
Tobías-Baraja Esther²
Moreno-Lozano Pedro²
Ferrer-Curriu Gemma³
Guitart-Mampel Mariona²
Planavila-Porta Ana³
Garrabou-Tornos Gloria²

¹Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain

²Department of Internal Medicine, Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, CELLEX-IDIBAPS, Faculty of Medicine and Health Sciences-University of Barcelona, Spain and CIBERER

³Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, Catalunya, Spain and CIBEROBN

Abstract

Aims: Cardiomyopathy (CMP) with a reduced ejection fraction develops in a dose-dependent manner in one-third of subjects with a long-term history of heavy daily alcohol consumption. Ethanol alters heart transduction signals including excitation-contraction sarcomeric coupling, causing diastolic and systolic left-ventricular (LV) dysfunction. Titin is a giant structural sarcomeric filament macro protein involved in contractile heart function and contributes to cardiac myocyte elastic recoil, a key factor for diastolic LV filling.

We evaluated whether titin expression is affected by chronic high-dose ethanol consumption in alcoholic CMP.

Methods and Results: We analyzed a total of 30 heart samples from human organ donors: 20 from high alcohol consumers (10 without CMP and 10 with CMP) and 10 healthy controls. Patient evaluation comprised daily and lifetime ethanol consumption, chest X ray, 2-D echocardiography and LV histology. CMP was assessed by functional and histological criteria. Titin activity was evaluated by specific immunohistochemical (IHC) and transcript expression (rtPCR) assays.

Titin IHC expression was clearly present in sarcomere areas of myocytes. Compared to healthy donors (82.58 ± 3.36), alcohol consumers showed a significantly lower cardiac titin expression (71.29 ± 3.16 ; $13.67 \pm 3.83\%$ decrease; $p=0.04$), being significantly lower in alcohol consumers with CMP (62.31 ± 4.18 ; $24.54 \pm 5.06\%$ decrease, $p<0.0009$), compared to both their counter-parts without CMP (80.27 ± 2.62 ; $2.80 \pm 3.17\%$ decrease vs. controls; $p<0.0030$ vs. alcoholic CMP). Titin transcript levels confirmed similar patterns of expression.

Conclusions: Cardiac sarcomeric titin expression is diminished by chronic alcohol consumption, especially when CMP has been developed. Titin is involved in the multifactorial pathogenic process of alcoholic CMP.

Keywords: Alcohol, Pregranulin, Myocardium, Titin expression, Cardiomyopathy.

Introduction

Alcoholic cardiomyopathy (CMP) is characterized by a dilated left-ventricle (LV) phenotype in subjects with high-dose persistent alcohol consumption [1-3] which is similar to genetically-linked cardiomyopathies. Twenty-three to 47 % of all dilated CMPs in developed

Article Information

Article Type: Research

Article Number: JCDM113

Received Date: 10 October, 2018

Accepted Date: 18 October, 2018

Published Date: 23 October, 2018

***Corresponding Author:** Dr. Fernández-Solà Joaquim, Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Villarroel 170, 08036, Spain, Fax: 00-34-93-2275400, Tel: 00-34-93-2275400, Email: [jfermand\(at\)clinic.cat](mailto:jfermand(at)clinic.cat)

Citation: Fernández-Solà J, Toll-Argudo M, Tobías-Baraja E, Moreno-Lozano P, Ferrer-Curriu G, Guitart-Mampel M, Planavila-Porta A, Garrabou-Tornos A (2018) Decreased Myocardial Titin Expression in Chronic Alcoholic Cardiomyopathy. J Cardiovas Disea Medic Vol: 1, Issu: 1 (63-70).

Copyright: © 2018 Fernández-Solà J. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

countries are related to alcohol misuse [4], and this disease develops in a cumulative, dose-dependent manner [5,6]. It is found in one-third to one-fourth of long-standing excessive alcohol consumers who have a mean lifetime cumulative ethanol dose >10 Kg ethanol/Kg body weight) [1,7] and it is the cause of high morbidity including arrhythmias and episodes of heart failure [8-10].

Excessive ethanol consumption exerts progressive, multifactorial damage to the myocardium inducing a diversity of noxious effects [3,7,11], most of which are synchronous and synergistic [7] and are only partially understood [11,12]. In the natural history of alcoholic CMP, these pathological mechanisms first produce diastolic [13,14] followed by systolic myocardium dysfunction [5], with progressive chamber dilatation and the development of structural changes (myocyte hypertrophy, necrosis and interstitial fibrosis), leading to myocyte apoptosis and cell loss, inducing the so-called alcohol-dilated CMP [1,4,7].

One of the most relevant mechanisms of alcohol-induced heart damage is related to the disruption of structural myocardial proteins [15,16]. Alcohol decreases the synthesis of panoply of cardiac proteins, modifies their expression and function and increases its degradation [12]. Myofibrillary proteins are one of proteins most frequently affected in this process. Thus, actin and α -myosin are decreased by 40%, with a reduction of their mRNA transduction process in rodent models [16], causing a progressive decrease in sarcomere contraction, ventricular dysfunction and progressive cardiac functional damage. Alcohol-induced heart damage also involves other structural (troponin, ankyrin, desmosome-related proteins), non-structural (mitochondrial, ribosomal, heat-shock proteins) and regulatory cardiac proteins (myostatin, IGF-1, FGF21, other cardiac myokines) [7,16-22]. This sequential process of alcohol-induced heart damage is relevant in the evaluation of the role of each specific protein [12].

Titin is a giant structural sarcomeric filament macroprotein which has shown to be clearly involved in contractile heart function [23-25]. This macroprotein is functionally related to passive myocardial stiffness and stress-sensitive signaling [26] and largely contributes to the elastic recoil of cardiac myocytes, a key-determinant factor in Frank-Starling relaxation, which is involved in diastolic left-ventricular filling [24,25,27]. Titin force, together with extracellular matrix, define passive myocardial stiffness [26-28]. Thus, titin plays a major role in heart disease and is involved in structural CMPs such as inherited dilated and hypertrophic CMP [29], and arrhythmogenic right ventricular dysplasia [30]. The potential involvement of titin in human ischemic heart disease [31], and the role of titin in diastolic heart failure [32,33] have also been described. In fact, the term "cardiac titin diseases" has been used to include the diverse heart diseases related to mutations, isoform variants, posttranslational modifications, hyperphosphorylation and upregulation of normal titin proteins involved in titin-related heart damage [26]. Changes in gene expression and titin content (connectin) have been reported in experimental studies in striated muscle of chronic alcohol-fed rats [34,35].

The process of passive myocardial stiffness and stress-sensitive signaling has been described in the first steps of the natural history of alcoholic CMP [27,32], and echocardiography has shown diastolic dysfunction in one third of chronic asymptomatic men consuming a total lifetime dose of ethanol >5 kg Ethanol/kg body weight [14]. There is recent evidence that titin truncating variants represent a prevalent genetic predisposition for alcoholic CMP, and are also associated with a worse left ventricular ejection fraction in dilated CMP patients who consume alcohol above recommended levels [36]. However, Titin involvement in alcoholic CMP has been scarcely explored until date. Therefore, we hypothesized that heart titin content and function may be affected by ethanol in the progressive pathogenic process of chronic alcoholic CMP.

The aim of the present study was to evaluate the potential involvement of the myocardial structural sarcomeric protein titin in alcohol-induced heart damage. We used tissue of human myocardium from heart donors and compared the degree of titin myocardial expression either by immunohistochemical (IHC) or transcript levels methods in heavy long-term alcohol consumers with or without CMP versus nonalcohol consumers free of heart disease (healthy control donors).

Methods

Patients

In a prospective five-year study from January 2006 to December 2011, we consecutively studied hearts from subjects with traumatic or cerebrovascular brain death considered suitable as organ donors by the transplant team of the Hospital Clínic of Barcelona (Barcelona, Spain). Myocardial structural and functional data and histological samples were obtained from age-matched (± 2 years) human organ donors prior to and after transplantation surgery, respectively.

Of 120 cadaveric donors under 70 years of age, 62 hearts were not suitable for transplantation and 4 samples were not properly recruited. Of these 58 latter organs, we finally selected: (i) 20 donors with a history of ethanol intake ≥ 60 g/day for more than 10 years (10 without CMP and 10 with CMP), and (ii) 10 control hearts from healthy people not eligible for implantation because of a lack of matched receptor or inadequate size.

All cases were admitted to the Intensive Care Unit where ventilatory and hemodynamic parameters were appropriately maintained at normal values throughout hospitalization: systolic blood pressure >100 mmHg, P_aO_2 >60 mmHg, and arterial pH within the normal range. None of the patients required in-hospital cardiopulmonary resuscitation maneuvers.

All the donors were white Caucasians of Spanish descent, who lived with their families in or around Barcelona, and none was indigent. The study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital Clínic of Barcelona (reference number HCB/2012/8005) and all the donor families provided informed consent for the use of

myocardium tissue in this study. All procedures in patients follow the guidance provided in the Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal editors and Code of Conduct for Journal Publishers (COPE), as well as the principles outlined in the Declaration of Helsinki. One third of these subjects had been included in previous studies on cardiac myostatin activity [19] and myocardial IGF-1 activity [20].

Clinical and Epidemiological Data

Using a structured questionnaire (“time-line follow-back method”) [37], a detailed history of ethanol intake was retrospectively obtained by consultation with family members, as previously reported in similar studies [5,19,38]. The duration of ethanol intake was calculated in each group as the total cumulated period of recent or previous alcohol consumption in years. The body mass index (BMI) was determined as the current body weight relative to the square of the body height (BMI, Kg/m²). Patients were considered to have caloric malnutrition if the BMI was < 17 Kg/m². Protein malnutrition was assessed by the following parameters obtained at hospital admission: hemoglobin, lymphocyte count, total protein, retinol-binding protein, pre-albumin and albumin.

Symptoms of heart failure and risk factors including smoking history, diabetes, cerebrovascular disease, hypertension and a history of ischemic heart disease were determined by clinical chart review, and the functional class was determined according to the American Heart Association Criteria [39]. Chest X-ray with measurement of the cardiothoracic index, conventional electrocardiography (ECG) and bidimensional echocardiography was carried out (Hewlet Packard Sonos 2500, USA. End-diastolic and-systolic diameter indices, the shortening fraction, left ventricular (LV) mass, and the ejection fraction (EF) were measured according to the standards of the American Society of Echocardiography [40]. CMP was defined as the presence of a left ventricular ejection fraction (LVEF) <50% and significant LV enlargement in addition to histologically evidenced structural cardiac damage. The personnel who performed and evaluated these tests were blinded to the alcoholic history of the patients.

Sample Processing and Immunohistochemistry

Stainings: To perform myocardium histological studies, a distal 3 cm sample of the LV apex was surgically excised (total weight of 4-5 g) with the donor under cold perfusion. The specimen was cut into fragments, and one of these was processed for further transcriptional studies, and maintained frozen at -80°C. The remaining fragments were snap frozen using liquid nitrogen until IHC study. For the histological studies, the specimens were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and toluidine-blue in semi-thin sections. Two independent observers (JF-S and P-M), who were blinded to group assignment, evaluated the degree of myocardial cell and nuclear hypertrophy, myocytolysis (defined as the presence of myofiber disarray or cell vacuolization) and interstitial fibrosis as reported previously [38]. In case of discordance, consensus agreement was established. The degree of global histological involvement was graded as

normal, mild, moderate, or severe (0/+/+/+/++) according to previous histologically defined criteria [38,41].

Myocardial titin expression was evaluated using conventional IHC procedures. In these, assay titin polyclonal expression is observed by microscopic examination as a slight brown pigment in sarcomeric areas of the cardiac myocytes in the presence of the protein. The intensity of expression is directly related to sarcomeric titin content [42]. Semi-thin cryostat sections of 6µm was obtained from the donor heart samples with ultra-microtome and fixed by paraformaldehyde 4% PBS solution during 30 min. at pH 7.40. After PBS washing, the sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 sodium citrate solution for 2 min at 4°C and washed with serum for 20 min. Incubation with anti-titin horse polyclonal serum (Abcam 7034, Cambridge, UK) was performed at 4°C for 18 h.

The next day, PBS/Triton 0.1% solution was applied for 5 min followed by incubation with secondary biotin antibody for 30 min at room temperature and the washing solution was repeated. Thereafter, the sections were incubated with ABC (Avidin-Biotin Complex, Vectron PK-7200, Burlingame, CA, USA) for 30 min at room temperature and washed again in PBS/Triton 0.1% solution. Revealing was performed with diaminobenzidine chromogen subtract for 10 min, under microscopic control, followed by 5 min of PBS/Triton 0.1%, and was then washed with distilled water and stained with H&E. After dehydration of the samples they were covered by DPX mounting solution for histological study.

Negative control slides were made in all the procedures using the same process without reagent incubation. Titin quantification was performed by two different qualified observers (JF-S and P-M) in at least 6 different fields (magnification 250x) of each sample, with at least 500 myocytes per field, according to a previously described method [19]. The titin IHC index was calculated by dividing the total number of highly positively stained heart myocyte cells in the titin assay by the total number of myocytes evaluated and multiplying this value by 100, as described elsewhere [19,38]. Non-myocyte cells or myocytes located at the edges of the tissues or in the interstitium were not counted.

Transcriptional Analysis

RNA isolation and Real-Time PCR. Total RNA was extracted using Tripure (Roche, Indianapolis, IN). Reverse transcriptase was performed in 20 µl, using random hexamers primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 0.5 µg RNA. PCR were conducted in duplicate for increased accuracy. Each 25 µl of reaction mixture contained 1 µl cDNA, 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM probes and 900 nM primers from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix or Assays-by-Design Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems). Taqman Gene Expression Assays were used. Each sample was run in duplicate and the mean value was used to calculate the mRNA expression of the gene of interest and the housekeeping reference gene (18S). The amount of the gene of interest in each sample was normalized to that of

Table 1: Clinical and epidemiological data of alcohol consumer donors with and without cardiomyopathy (CMP) and non-alcoholic controls included in the study.

Group	Healthy controls	Alcohol consumer donors		p value
	(n=10)	without CMP (n=10)	with CMP (n=10)	
Age (years)	60.0 ± 13.9	51.4 ± 7.58	54.1 ± 10.77	n.s.
Gender (M/F, ratio)	6/4	6/4	6/4	n.s.
Daily alcohol intake (grams, mean ± SD)	0	113.0 ± 57.55	127.0 ± 60.19**	<0.01
Duration of alcohol intake (years, mean ±SD)	0	19.1 ± 4.15	25.4 ± 4.53**	<0.01
Lifetime dose of alcohol (Kg ethanol/Kg body weight, mean ±SD)	0	12.13 ± 4.04	15.26 ± 10.09**	<0.01
Cause of death (n,%)				
-Cranial trauma	5	2	0	n.s.
-Cerebrovascular disease	5	6	9	
-Other	0	2	1	
NYHA function (n,%)				
Class I	10 (100%)	6 (60%)	0	<0.01
Class II	0	4 (40%)	7 (70%)	
Class III-IV	0	0	3 (30%)	
Cardiothoracic index (mean ± SD)	0.49 ± 0.028	0.5 ± 0.017	0.57 ± 0.069*	<0.05
End-systolic diameter (mm/m ² , mean ± SD)	17.2 ± 1.7	19.7 ± 3.5	28.5 ± 6.5**	<0.01
End-diastolic diameter (mm/m ² , mean ± SD)	28.3 ± 1.6	29.9 ± 3.4	35.1 ± 6.2**	<0.01
Left ventricular ejection fraction (% , mean ± SD)	60 ± 3	55 ± 5	38 ± 7**	<0.01
Electrocardiogram (abnormal cases, n%)	2	4	7	<0.05***

*p<0.05 compared to alcohol consumers without CMP and controls, **p<0.01 compared to alcohol consumers without CMP and controls, ***p<0.05 compared to controls. ANOVA test, after checking Normality distribution of parameters by Kolmogorov-Smirnov and Shappiro Wilkoxon tests. M/F: male/female, NYHA: New York Heart Association, SD: Standard Deviation

the reference control using the comparative (2-DeltaCT) method following the manufacturer’s instructions.

Statistics

The data were analyzed using SPSS v22 statistical software. Differences among groups were seek using one-way ANOVA test, after checking Normality distribution of parameters by Kolmogorov-Smirnov and Shappiro Wilkoxon tests. Pearson correlation coefficients between the variables were calculated. All the variables followed a normal distribution and were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). A two-tailed P value <0.05 was considered statistically significant with a confidence interval (CI) of 95%.

Results

After donor assessment, we collected a total of 30 heart samples. Of these, 20 were from chronic alcohol consumers (>10 years of lifetime consumption and >60 g of daily alcohol consumption). After the cardiac studies, the samples from chronic alcohol consumers were divided into two groups: one without evidence of dilated CMP (showing LVEF >50% and no histological signs of myocardial structural damage; n=10), and another with dilated CMP (presenting a LVEF <50% and histological signs of myocardial structural damage; n=10). In addition, in the same period, 10 healthy non-alcoholic donors with no evidence of heart disease were matched with the alcoholic group by age (+ 2 years) and gender, and were also included in the study.

Table 1 summarizes the mean clinical and epidemiological data of the alcohol consumer donors with and without dilated CMP and controls included in the present study. Age and gender were similar in the three groups. Protein or caloric malnutrition was absent in all the control donors studied and was present in 2 alcohol consumers with CMP and in 2 alcohol consumers without CMP, being BMIs comparable among the three groups. Twelve of the 20 chronic alcohol consumers (60%) had stable liver disease, with a moderate increase of aspartate aminotransferase (mean 62+12 IU/L) and gamma glutamyl transpeptidase (mean 73+15 IU/L) levels compared to non-alcohol consumer controls (p<0.05). As expected, daily alcohol intake, duration of alcohol intake and lifetime alcohol consumption were significantly higher in alcohol consumers with CMP as compared to those without CMP and the controls, in accordance to previous clinical series reports [38]. Cerebrovascular death tended to be more frequent in alcohol consumers than in controls. Forty percent of alcohol consumers without CMP and all the alcohol consumers with CMP presented an abnormal function class. The cardiothoracic index, end-systolic and end-diastolic LV diameters were significantly higher, and the LVEF was significantly lower in alcohol consumers with CMP compared to their counterparts without CMP and the controls. We observed a good correlation between the cardiothoracic index and the left ventricle end-diastolic diameter (r=0.68, p<0.01). Abnormal ECG findings (LV hypertrophy, extrasystoles, defects in conduction and repolarization) were present in 40% of alcohol consumers without CMP and 70% of alcohol consumers with CMP.

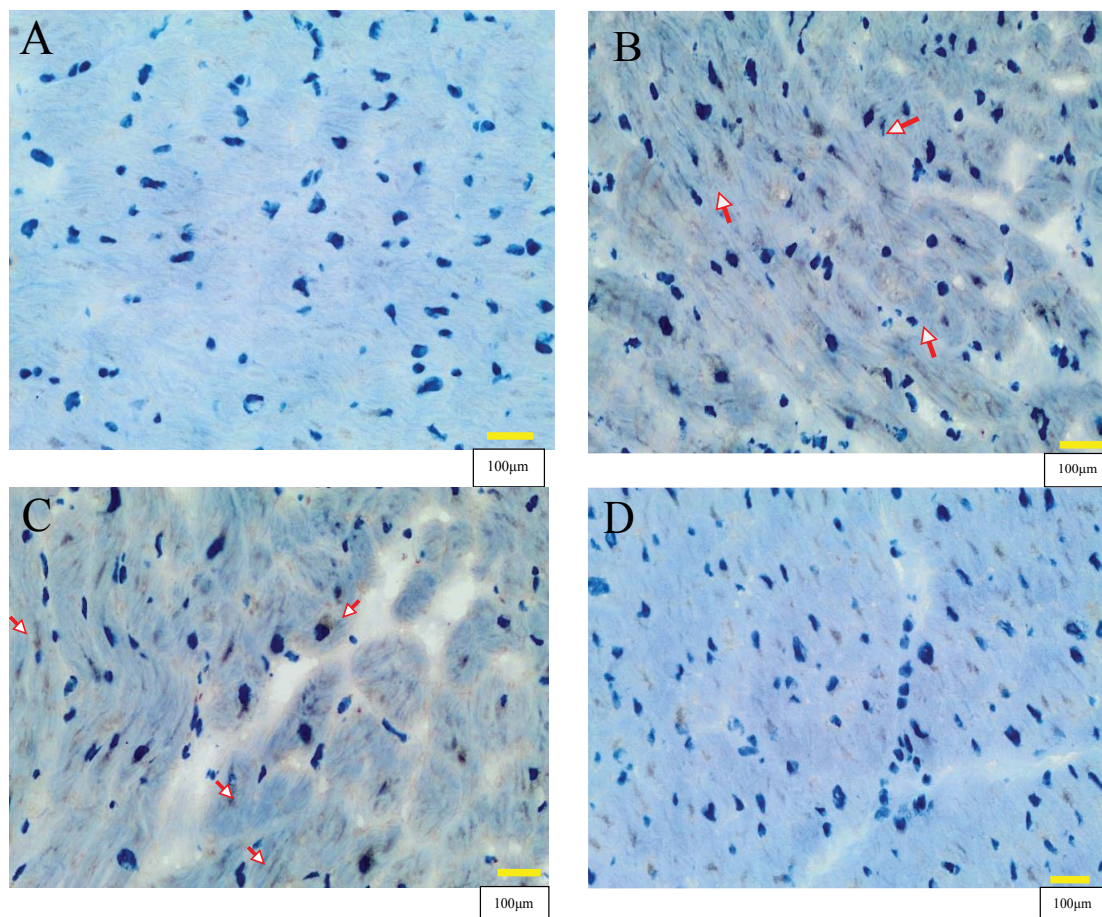


Figure 1: Titin immunohistochemical cardiac studies in control non-alcohol consumer donors (n=10) and chronic alcohol consumer donors (n=20). Figure 1A: Negative heart controls only stained with hematoxylin. Figure 1B: Positive heart control with titin-specific antibody staining showing clear slight positivity by a dark brown color in sarcomere areas (arrows). Figure 1C: Alcohol consumer donor without CMP showing positive titin expression in a high percentage of myocytes (arrow), similar to the pattern from a non-alcohol consumer control. Figure 1D: Alcohol consumer donor with CMP showing a significant decrease in the immunohistochemical titin expression. Magnification x 400. Scale bar: 100µm.

Table 2 shows the degree of histological damage according to the semi-quantitative score (absent/low/moderate/severe) applied in the histological myocardial study. As expected, alcohol consumers with CMP presented a greater degree of histological damage (myocyte hypertrophy, necrosis and interstitial fibrosis) compared to their counterparts without CMP and to the non-alcohol consumer controls (p<0.05).

Negative controls for IHQ were only stained with hematoxylin (Figure 1A). After processing and microscopic evaluation of all the samples for titin IHC expression, a dark brown color in sarcomere areas showed clear positivity where the titin specific antibody was used (Figure 1B). The inter-myocyte variability in titin expression was of note (Figure 1B) in that some cardiac myocytes clearly expressed titin while others showed low titin expression, where the primary antibody was not captured by sarcomere.

Table 2 and Figures 1 and 2 show the cardiac titin IHC expression. First, we compared the percentage of titin IHC expression in healthy donors versus the two alcohol consumer groups, and we found that alcohol consumer donors showed significantly lower myocardial titin

Table 2: Degree of histological damage and immunohistochemical (IHC) titin expression in the myocardial study.

Group	Healthy controls (n=10)	Alcohol consumer donors without CMP (n=10)	Alcohol consumer donors with CMP (n=10)	p value
Histological heart damage (n, %)	9	0	0	<0.05*
-Absent	1	7	1	
-Low	0	3	7	
-Moderate	0	0	2	
IHC titin activity (% positive cells)	82.58	80.27	62.31*	<0.001* (0.0005)
SEM	3.36	2.62	4.18	
Range	30.02	24.60	45.75	
Standardized Kurtosis	-0.899	0.125	0.393	
Titin Transcript level (Titin RNA/18SrRNA)	0.00032	0.000047	0.0001283	NS
Mean	0.00018	0.000013	0.000069	
SEM				
CMP: Cardiomyopathy, SD: Standard Deviation, NS: Nonsignificant, *Compared to alcohol consumer donors without cardiomyopathy and controls. ANOVA test, after checking Normality distribution of parameters by Kolmogorov-Smirnov and Shappiro Wilkoxon tests.				

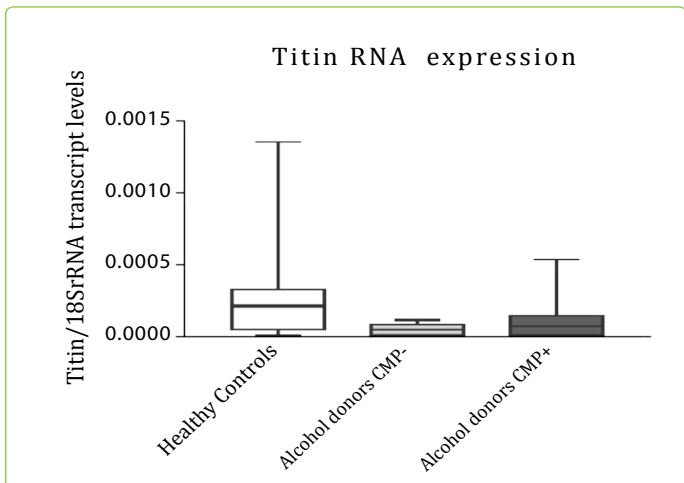


Figure 2: Titin transcriptional expression in alcohol consumer donors with (n=10) and without cardiomyopathy (CMP) (n=10) and non-alcohol consumer controls (n=10). Results expressed in Titin RNA/18SrRNA (mean ± SEM); ANOVA test, after checking Normality distribution of parameters by Kolmogorov-Smirnov and Shappiro Wilkoxon tests.

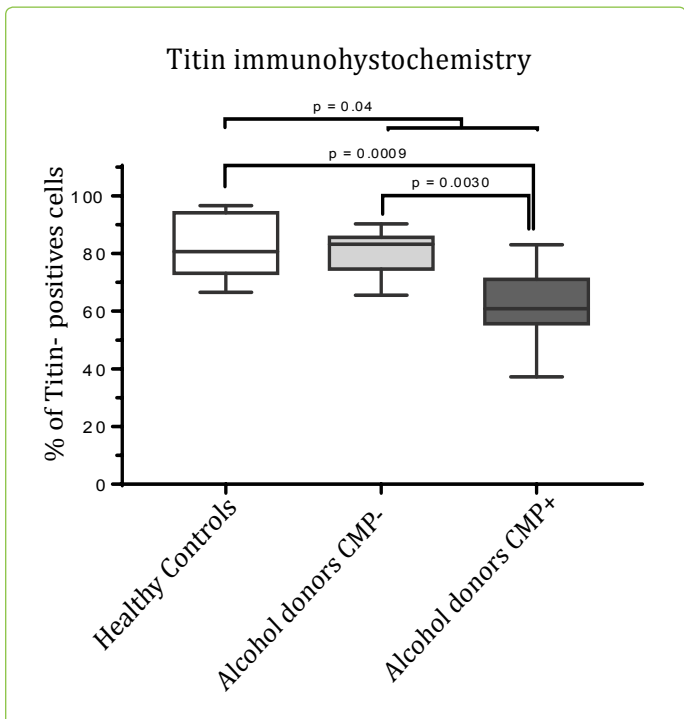


Figure 3: Titin immunohistochemical expression in alcohol consumer donors with (n=10) and without cardiomyopathy (CMP) (n=10) and non-alcohol consumer controls (n=10). Results expressed in % of positive cells (mean ± SEM); ANOVA test, after checking Normality distribution of parameters by Kolmogorov-Smirnov and Shappiro Wilkoxon tests.

expression (healthy donors 82.58%+3.36 vs. all chronic alcohol consumer donors 71.29+3.16, p=0.04).

In order to assess if the presence of CMP was relevant for cardiac titin IHC activity, we divided the group of alcohol consumer donors according to the presence or absence of CMP and compared these with the control donors. Table 2 shows the means and 95% CI of these three groups. We observed a significant decrease in IHC titin activity in chronic alcohol consumers with CMP compared to their counterparts without CMP (62.31+4.18% vs. 80.27+2.62%,

p=0.003). Similarly, titin IHC expression was significantly lower in alcohol consumer donors with CMP compared to healthy controls non-alcohol consumers (62.31+4.18% vs. 82.58+3.36%, p=0.0009).

Figures 1C and 1D shows the different titin IHC expression according to the presence or absence of CMP. Thus, chronic alcohol consumer donors without CMP (Figure 1C) showed positive titin expression in a high percentage of myocytes (similar to healthy controls non-alcohol consumers) compared to chronic alcohol consumer donors with CMP (Figure 1D) who had a clear and significant decrease in IHC titin expression.

Figure 3 shows the relationship between the different groups of donors evaluated and the percentage of myocardial titin expression (% of higher titin IHC-positive cells).

To confirm these findings, Titin levels were parallelly evaluated through transcriptional assays and found similar patterns than those evaluated through IHQ, in all studied groups (Figure 3).

Discussion

The objective of the present study was to assess the effect of chronic alcohol consumption and the presence of CMP on titin expression in different groups of human heart donors. To that aim, we performed an IHC staining and transcriptional analysis in myocardial tissue from healthy control human donors and donors with high-dose chronic alcohol consumption to detect the expression of the sarcomeric titin protein in cardiac myocytes.

As described previously, titin was clearly expressed with a characteristic brown stain [42,43] in the sarcomeric area of the majority of cardiac myocytes (83%) in healthy non-alcohol consumer control donors. On comparing healthy non-alcohol consumer controls with all the chronic alcohol consumers, we found the cardiac expression of titin to be significantly lower in donors who had consumed significant high doses of alcohol, demonstrating a direct effect of chronic alcohol consumption on decreasing titin IHC cardiac expression. In addition, when we evaluated the role of dilated CMP in alcohol consumer donors, we also observed that IHC titin decrease was significant in myocardial alcohol consumers with CMP compared to both those without CMP and non-alcohol consumer controls. These different patterns of Titin expression, despite non-significant, were confirmed by alternative techniques as transcriptional assays were we found a tendency to decrease Titin 18/SR mRNA transcription levels in those chronic alcohol consumers affected or not of CMP in comparison to non-alcoholic controls. This fact suggests that the decrease in cardiac myocyte Titin mRNA transcription content could be mainly related to chronic alcohol effect than to the presence of CMP and that protein expression is more relevant than transcript.

Furthermore, the negative effect of alcohol on myocyte titin IHC expression in the presence of CMP is in concordance with what happens to other sarcomeric structural proteins such as actin and myosin that are also affected by alcohol misuse [16,44], and may be due to the cardiac remodeling

process [45,46]. In the case of titin, since it is a sarcomeric protein functionally related to the cardiac relaxation process [26,47], the findings of the present study provide additional evidence of the damaging effect of chronic ethanol consumption which induces LV diastolic dysfunction in one third of chronic alcohol misusers [13,14].

However, this decreased titin myocyte expression is not specific of alcohol-induced CMP since sarcomeric titin content may also be decreased by many other causes of heart damage such as inherited hypertrophic and dilated CMP [29], ischemic cardiopathy [31] idiopathic dilated CMP [28], arterial hypertension [42,48] and arrhythmogenic right ventricular dysplasia [30]. In fact, the term “cardiac titin diseases” has been proposed and includes all cardiac diseases involved in titin dysfunction [26].

Similar to that happens at a clinical level, different experimental studies in rats have evaluated whether chronic alcohol consumption disrupts myocardial contractile proteins [12,15,44]. Specifically, alcohol decreases the α -actin isoform and the myosin heavy chain by 40% but increases the β -actin isoform [16]. Changes in gene expression and isoform composition but not in total titin content in cardiac muscle of chronically ethanol-fed rats have been described, suggesting that these changes are involved in the development of pathologic processes [35]. In accordance to what happens with these myofibrillary proteins, several non-structural myocardial proteins involving mitochondrial function, membrane-related proteins, glycolytic enzymes, transduction-signal sarcoplasmic proteins, genetic transduction-related proteins and antioxidant mechanisms are affected by chronic alcohol consumption [12,16]. In addition, a clear decrease in heat-shock proteins also develops, producing a loss in myocardial protective mechanisms [18]. With respect to titin, in experimental studies in rats, titin cardiac isoform expression was decreased in LV with increased hypertrophy [42] or in the presence of pulmonary hypertension [49]. A reduction in titin may produce sarcomeric insufficiency and contribute to the development of dilated CMP [28]. Thus, the multiple effects induced by ethanol itself in cardiac myocytes [7] are further increased when structural proteins such as titin are altered.

With respect to study limitations, since this study was performed in human heart donors, the sample size was limited due to the difficulty in obtaining this type of human specimen, and this may minimize some group comparisons with difficult statistical findings, in case of transcriptional assays. No other changes in posttranslational modifications of titin, phosphorylation or titin genotypes were analyzed in this study. Epitopes of Titin may affect the binding specific of the anti-titin antibodies used in this study [36]. Therefore, changes in titin expression are merely associated with alcoholic CMP and do not demonstrate a causal relationship between titin and alcoholic CMP. Similarly, evaluation of diastolic function was not included in the cardiac assessment of the donors. Lastly, alcohol consumption was retrospectively evaluated by consultation with family and

relatives of heart donors.

Despite these inconveniences and according to the results of the present study, we can conclude that chronic excessive alcohol consumption significantly decreases titin myocardial expression, with this alcohol-induced effect being higher when structural cardiac damage and remodeling are present. Since titin is a structural protein related to LV distensibility, this decrease in titin expression may justify the previously described LV diastolic dysfunction reported in one third of chronic alcohol users in the subclinical phase of CMP [13,14]. This fact may also be related to the development of the so-called heart failure with preserved ejection fraction [33,48,49].

Titin cardiac expression may be used as an additional marker of alcohol-induced heart damage which appears in first steps of subclinical alcohol-dilated CMP. Indeed, cardiac expression of titin significantly decreases in the process of cardiac remodeling and dilated CMP. Strategies to preserve myocardial titin activity as well as other cardiac proteins, avoid protein malnutrition, lack of physical exercise, and oxidative damage, and stabilize liver or other alcohol-related systemic diseases [50] may contribute to preventing the progressive development of cardiac dysfunction and structural damage in alcoholic CMP.

Funding

This work was supported by grant Suport Grups de Recerca 2014-1158 from the Generalitat de Catalunya; Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Spain and La Marato TV3 2015/33 30/31 Generalitat de Catalunya.

References

1. Urbano-Márquez A, Fernández-Solà J (2004) Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. *Muscle Nerve*. 30: 689-707.
2. Iacovoni A, De Maria R, Gavazzi A (2010) Alcoholic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med*. 11: 884-892.
3. Piano MR, Phillips SA (2015) Alcoholic cardiomyopathy: Pathophysiologic insights. *Cardiovasc Toxicol*. 14: 291-308.
4. Guzzo-Merello G, Segovia J, Dominguez F, Cobo-Marcos M, Gómez-Bueno M, et al. (2015) Natural history and prognostic factors in alcoholic cardiomyopathy. *JACC Heart Fail*. 3: 78-86.
5. Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont L, et al. (1989) The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med*. 320: 409-415.
6. O'Keefe JH, Bhatti SK, Bajwa A, DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, et al. (2014) Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison...or the remedy. *Mayo Clin Proc*. 89: 382-393.
7. Fernández-Solà J (2015) Cardiovascular risk and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nature Rev Cardiol*. 12: 576-587.
8. Guzzo-Merello G, Domínguez F, González-López E, Cobo-Marcos M, Gómez-Bueno M, et al. (2015) Malignant ventricular arrhythmias in alcoholic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 199: 99-105.
9. Tonelo D, Providencia R, Gonçalves L (2013) Holiday Heart Syndrome revisited after 34 years. *Arq Bras Cardiol*. 101: 183-189.
10. Walsh CR, Larson MG, Evans JC, Djousse L, Ellison RC, et al. (2002) Alcohol consumption and risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*. 136: 181-191.

11. Ren J, Wold LE (2008) Mechanisms of alcoholic heart disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2: 497-506.
12. Lang CH, Frost RA, Summer AD, Vary TC (2005) Molecular mechanisms responsible for alcohol-induced myopathy in skeletal muscle and heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 2180-2195.
13. Kupari M, Koskinen P, Suokas A, Ventilä M (1990) Left ventricular filling impairment in asymptomatic chronic alcoholics. *Am J Cardiol.* 66: 1473-1477.
14. Fernández-Solà J, Nicolás JM, Paré JC, Sacanella E, Fatjó F, et al. (2000) Diastolic function impairment in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 24: 1830-1835.
15. Preedy VR, Atkinson LM, Richardson PJ, Peters TJ (1993) Mechanism of ethanol-induced cardiac damage. *Br Heart J* 69: 197-200.
16. Fogle RL, Lynch CJ, Palopoli M, Deiter G, Stanley BA, et al. (2010) Impact of chronic alcohol ingestion on cardiac muscle protein expression. *Alcohol Clin Exp Res.* 34:1226-1234.
17. Fatjó F, Fernández-Solà J, Lluís M, Elena M, Badía E, et al. (2005) Miocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 29: 864-870.
18. Kötter S, Unger A, Hamdani N, Lang L, Vorgerd M, et al. (2014) Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heart shock proteins. *J Cell Biol.* 204: 187-202.
19. Fernández-Solà J, Lluís M, Sacanella E, Estruch R, Antúnez E, et al. (2011) Increased myostatin activity and decreases myocyte proliferation in chronic alcoholic cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res.* 35:1220-1229.
20. Borrissier-Pairó F, Antúnez E, Tobías E, Fernández-Solà J (2013) Insulin-like growth factor 1 myocardial expression decreases in chronic alcohol consumption. *Regen Med Res.* 1: 1-8.
21. Planavila A, Redondo-Angulo I, Villarroya F (2015) FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front Endocrinol.* 6: 133.
22. Zhang B, Turdi S, Li Q, López FL, Eason AR, et al. (2010) Cardiac overexpression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) attenuates chronic alcohol intake-induced myocardial contractile dysfunction but not hypertrophy: role of Akt, mTOR, GSK3 β and PTEN. *Free Radic Biol Med.* 49: 1238-1253.
23. Granzier HL, Labeit S (2004) The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signalling and disease. *Cir Res.* 94: 284-295.
24. LeWinter MM, Granzier HL (2010) Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation.* 121: 2137-2146.
25. Brian R, Anderson, Henk L, Granzier HL (2012) Titin-based tension in the cardiac sarcomere; molecular origin and physiological adaptations. *Prog Biophys Mol Biol.* 110: 204-217.
26. LeWinter MM, Granzier HL (2014) Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 63: 207-212.
27. Labeit S, Kolmerer B (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 270: 293-296.
28. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Benson CC, et al. (2015) Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science.* 349: 982-986.
29. Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, et al. (2012) Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *New Engl J Med.* 366: 619-628.
30. Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, et al. (2011) Genetic variations in titin *Circulation.* 128: 876-885.
31. Neagoge C, Kulke M, Del Monte F, Gwathmey JK, De Tombe PP, et al. (2002) Titin isoforms switch in ischemic human heart disease. *Circulation.* 106: 1333-1341.
32. Borbély A, Van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes J, et al. (2005) Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation.* 111: 774-781.
33. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis J, Stroud RE, Nietert PL, et al. (2015) Myocardial stiffness in patients with heart failure and preserves ejection Fraction. Contributions of collagen and titin. *Circulation.* 131: 1247-1259.
34. Hunter RJ, Neagoe C, Järveläinen HA, Martin CR, Lindros KO, et al. (2003) Alcohol affects the skeletal muscle proteins titin and nebulin in male and female. *J Nutr.* 133: 1154-1157.
35. Gritsyna IV, Salmov NN, Vikhliantsev IM, Ulanova AD, Sharapov G, et al. (2013) Changes in gene expression and content of titin (connectin) in 20 striated muscles of chronically ethanol-fed rats. *Mol Biol.* 47: 996- 1003.
36. Ware JS, Amor-Salamanca A, Tayal U, Govind R, Serrano I, et al. (2018) Genetic Etiology for Alcohol-Induced Cardiac Toxicity. *J Am Coll Cardiol.* 71: 2293-2302.
37. Sobell LC, Maisto SA, Sobell MB, Cooper AM (1979) Reliability of alcohol abusers self-reports of drinking behavior. *Behav Res Ther.* 17: 157-160.
38. Fernández-Solà J, Estruch R, Grau JM, Pare JC, Urbano-Márquez A, et al. (1994) The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med.* 120: 529-536.
39. Dolgin M, Fox AC, Gorlin R, Levin RI (1994) New York Heart Association. Criteria Committee. *Classes of Heart Failure. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels.* 9th ed. Boston, MA: Lippincott Williams and Wilkins.
40. Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, et al. (2004) American Society of Echocardiography. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr.* 17: 1086-1119.
41. Nicolás JM, Fernández-Solà J, Estruch R, Paré JC, Urbano-Márquez A, et al. (2002) The effect of controlled drinking in alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med.* 136: 192-200.
42. Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML, et al. (2003) Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res.* 9: 86-94.
43. Castro-Ferreira R, Fontes-Carvalho R, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF (2011) The role of titin in the modulation of cardiac function and its pathophysiological implications. *Arq Bras Cardiol.* 96: 332-339.
44. Vary TC, Deiter G (2005) Long-term alcohol administration inhibits synthesis of 21 both myofibrillar and sarcoplasmic proteins in heart. *Metabolism.* 54: 212-219.
45. Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 358: 1370-1380.
46. Fernández-Solà J, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, et al. (2006) Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Hum Pathol.* 37: 1100-1110.
47. Granzier HL, Radke MH, Peng J, Westermann D, Nelson OL, et al. (2009) Truncation of titin-s elastic PEVK region leads to cardiomyopathy with diastolic dysfunction. *Circ Res.* 105: 557-564.
48. Ly T, Chan LL, Lam CS (2016) Heart failure with preserved ejection fraction in hypertension. *Curr Opin Cardiol.* 3: 410-416.
49. Rain S, Bos Dda S, Handoko ML, Westerhof N, Stienen G, et al. (2014) Protein changes contributing to right ventricular cardiomyocyte diastolic dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *J Am Heart Assoc.* 3: e000716.
50. Fernández-Solà J, Planavila Porta A (2016) New Treatment Strategies for Alcohol-Induced Heart Damage. *Int J Mol Sci.* 17: E1651.

Citation: Fernández-Solà J, Toll-Argudo M, Tobías-Baraja E, Moreno- Lozano P, Ferrer-Curriu G, Guitart-Mampel M, Planavila-Porta A, Garrabou-Tornos A (2018) Decreased Myocardial Titin Expression in Chronic Alcoholic Cardiomyopathy. *J Cardiovas Disea Medic* Vol: 1, Issu: 1 (63-70).

