

IGF-1: Un factor de crecimiento con acciones cardiovasculares pleiotrópicas

Ariel Contreras^{1,2,*}, Pablo Aránguiz^{1,2,*}, Jessica Díaz^{1,2}, Mario Chiong^{1,2}, Juan Pablo Muñoz^{1,2}, Valentina Parra^{1,2}, Cristián Ibarra^{1,2}, Diego Rojas^{1,2}, Rodrigo Troncoso^{1,2}, Verónica Eisner^{1,2}, Daniela Salas^{1,2}, Andrea Rodríguez^{1,2}, Loreto Carrasco^{1,2}, Guillermo Díaz-Araya^{1,2}, Sergio Lavandero^{1,2}.

¹Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,

²Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula,

³Instituto Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile.

*Ambos autores contribuyeron en forma similar en este trabajo.

El factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1) es un péptido relacionado estructural y funcionalmente con insulina que posee efectos mitogénicos y citoprotectores. Sus efectos biológicos dependen de la activación del receptor de IGF-1 (IGF-1R), perteneciente a la familia de receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca y que se localiza en la superficie celular. IGF-1 es el principal mediador fisiológico de la hormona del crecimiento y dado que su gen se expresa en múltiples tejidos, este factor es clave en la comunicación endocrina, paracrina y autocrina. Recientes evidencias muestran que IGF-1 ejerce variadas acciones pleiotrópicas en el sistema cardiovascular, destacándose sus efectos en la hipertrofia, muerte y regeneración celular. En el corazón, IGF-1 promueve su crecimiento, mejora su contractibilidad, facilita el metabolismo de la glucosa, disminuye el nivel de insulina circulante, aumenta la sensibilidad a esta hormona, estabiliza el perfil lipídico y estimula la regeneración del músculo cardíaco. Evidencias clínicas y experimentales han mostrado que el deterioro de la función cardíaca se asocia a bajos niveles circulantes de IGF-1. Alteraciones tanto en los niveles de IGF-1 como en su sistema transduccional se consideran factores de riesgo para el desarrollo de distintas patologías cardíacas. Todos estos antecedentes destacan el papel del IGF-1 en cardioprotección y su potencialidad para el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en estos efectos prácticamente se desconocen. En esta revisión, junto con entregar antecedentes actualizados y críticos de las acciones cardiovasculares del IGF-1, se proyectan sus aplicaciones terapéuticas.

IGF-1: A growth factor with pleiotropic cardiovascular actions

Insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) is a mitogen and cytoprotective peptide functionally and structurally related to insulin. Its biological effects are mediated by the IGF-1 receptor (IGF-1R) belonging to cell surface receptor family with intrinsic tyrosine kinase activity. IGF-1 mediates most of systemic effects of growth hormone and its expression has been detected in many tissues, playing a critical role in endocrine, paracrine and autocrine signaling. Recent evidences show that IGF-1 exerts distinct pleiotropic actions in the cardiovascular system, being the most important effects on heart hypertrophy, cardiac death and regeneration. In the heart, IGF-1 promotes growth, improves contractibility,

Correspondencia: Dr. Sergio Lavandero G.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile, Olivos 1007,
Santiago 838-0492.
Correo electrónico: slavander@uchile.cl

facilitates glucose metabolism, decreases circulating insulin levels, increases sensitivity to insulin, stabilizes lipid profile and stimulates cardiac muscle regeneration. Clinical and experimental evidences have shown that a decrease in cardiac function is associated to low circulating IGF-1 levels. Changes both in IGF-1 levels and its signaling system are considered risk factors to the development of some cardiac pathologies. Collectively, these evidences highlight the importance of IGF-1 on cardioprotection and its potential applications for cardiac pathology treatment. However, the molecular mechanisms involved on these effects remain unknown. In this review we update the cardiovascular actions of IGF-1 and we critically analyze this information and its therapeutical projections.

Key words: IGF-1, cardiac growth, cardioprotection.

Recibido el 14 de noviembre de 2006, aceptado el 21 de diciembre de 2006.

Rev Chil Cardiol 2006; 25 (3): 317-330

Factor de crecimiento análogo a insulina y su receptor

En 1957, Salomón y Daughaday identificaron dos péptidos que designaron con los nombres de "factores de sulfatación" por su capacidad de estimular la incorporación de azufre radiomarcado en el cartílago de rata. Por otra parte, Froesch et al. también describieron que dos componentes solubles del suero poseían una actividad análoga a insulina no suprimible (NSILA)¹. En 1972, los nombres de factor de sulfatación y NSILA se reemplazaron por el término unificador "Somatomedina", para referirse a una sustancia que mediaba los efectos sistémicos de la hormona de crecimiento (GH)². En 1976, Rinderknecht y Humbel aislaron dos sustancias activas desde el suero humano, que debido a su semejanza estructural con la

proinsulina, se renombraron como "factores de crecimientos análogos a insulina (IGF) tipos 1 y 2. Los IGFs son integrantes de una familia de péptidos relacionados a la insulina que también incluye a la relaxina³. El IGF-1 es un péptido pequeño de 70 aminoácidos con una masa molecular de 7.649 Dalton⁴ y dos puentes disulfuro en residuos de cisteínas le otorgan una estructura tridimensional semejante a la insulina (figura 1) y que explica su propiedad de interactuar con el receptor de insulina (IR), aunque esta interacción sea de baja afinidad. El gen para IGF-1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma humano 12q23-23^{5,6} y consiste en seis exones, incluyendo dos exones líderes, regulados por dos promotores⁷.

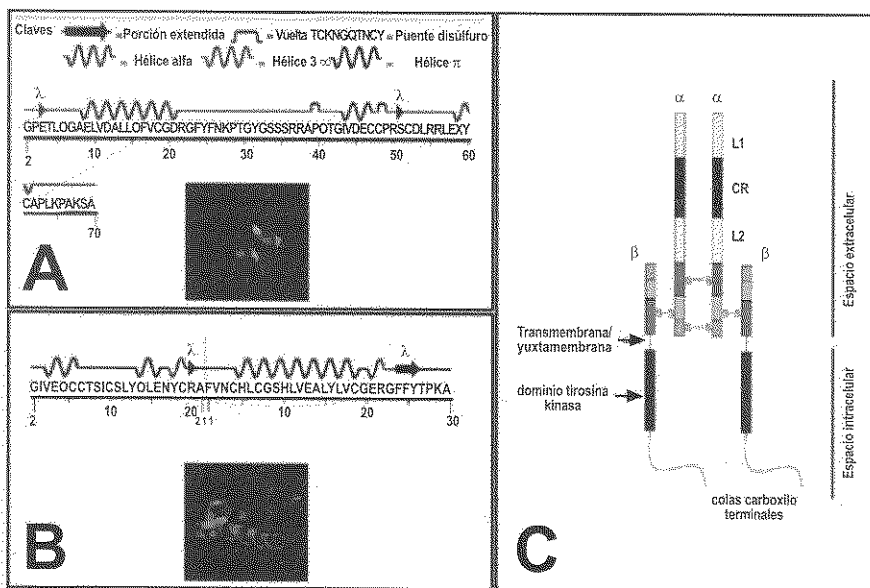


Figura 1. Representación esquemática del IGF-1, Insulina y el receptor de IGF-1. Los paneles A y B muestran las secuencias de aminoácidos correspondientes al IGF-1 e insulina, respectivamente, junto con sus correspondientes conformaciones regionales y determinación de estructuras por resonancia magnética nuclear de protones. Se puede apreciar la existencia de tres segmentos de hélice, que le confieren similitud estructural. En C se muestra al receptor de IGF-1 y sus correspondientes segmentos. La región CR, rica en residuos de cisterna, interacciona con IGF-1 produciendo un cambio conformacional de la estructura que provoca el acercamiento de sus dominios tirosina kinasa en el citoplasma celular y posterior fosforilación por transactivación.

El receptor de IGF-1 (IGF-1R) integra la superfamilia de receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca, la cual también incluye al receptor de insulina (IR) y al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR)^{8,9}. El IGF-1R humano es el producto de un gen de copia única que comprende más de 100 kilo bases en el cromosoma 15q25-26¹⁰. Este gen contiene 21 exones y también está estructuralmente relacionado al gen del (IR)¹¹. Tanto IGF-1R como su homólogo cercano IR son dímeros unidos por puentes disulfuro de la forma $(\alpha\beta)_2$, localizados en la superficie celular, donde cada monómero está compuesto por una cadena α que mira al espacio extracelular y una cadena β de transmembrana, con un dominio hacia el extracelular y otro hacia el citoplasma celular¹². La porción intracelular de cada monómero consiste en dominios de transmembrana y de yuxtamembrana, seguidos por un dominio con actividad enzimática tipo tirosina kinasa y una cola citoplasmática (Fig. 1)¹³. El receptor une a IGF-1 con alta afinidad y también a insulina, aunque con una afinidad inferior. Schäffer et al. propusieron un mecanismo entrecruzado de interacción ligando-receptor para explicar la cooperatividad negativa y los gráficos de Scatchard curvilíneos observados^{14,15}.

IGF-1 en la comunicación endocrina, autocrina y paracrina del corazón

La GH puede ejercer efectos metabólicos directos. Sin embargo, sus efectos biológicos más relevantes son indirectos y en su mayoría mediados por la estimulación

de la expresión hepática de IGF-1 (acción endocrina) y en tejidos periféricos (acción autocrina y paracrina). En animales transgénicos con expresión de IGF-1 tejido específica, Sjögren et al. y Yakar et al. demostraron la importancia del IGF-1 producido localmente respecto del de origen circulante, en sus efectos sobre el crecimiento del músculo cardíaco. Aunque el IGF-1 hepático es el principal contribuyente de los niveles de IGF-1 circulantes, éste no es tan crítico en la etapa postnatal normal. Se ha evidenciado que una fina regulación entre los efectos endocrinos y/o autocrino-paracrino del IGF-1, son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis de las células cardíacas^{16,17}. En este sentido, hay nuevas evidencias que apuntan a fortalecer el concepto de un eje GH-IGF-1 a nivel del corazón¹⁸⁻²¹. El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) se expresa ampliamente en el miocardio y la interacción con su ligando, estimula la biosíntesis de IGF-1, actuando de manera auto y paracrina en el corazón¹⁹. Estudios, tanto en animales como en humanos, han proporcionado abundante evidencia de que el eje GH-IGF-1 participa en la regulación de la estructura y función de las células cardíacas. De esta forma una célula cardíaca estimulada con GH activa un sistema de transducción orientado principalmente a la expresión local del gen IGF-1. Posteriormente, el IGF-1 sintetizado y secretado hacia el espacio extracelular, puede actuar de manera autocrina y/o paracrina sobre las células circundantes, modificando su función (figura 2).

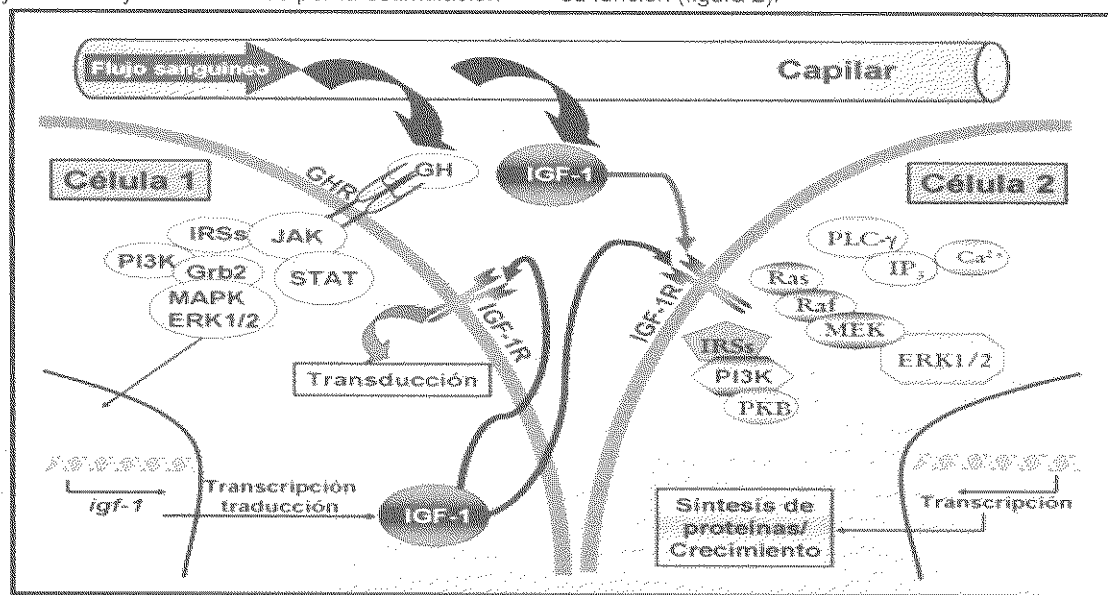


Figura 2. Efecto endocrino, autocrino y paracrino del IGF-1 en corazón. La hormona de crecimiento (GH) llega a las inmediaciones celulares desde la circulación y estimula a su receptor que rápidamente recluta su sistema de señalización para dar como resultado final la expresión del IGF-1. Este IGF-1 puede actuar de manera autocrina (flecha negra), paracrina (flecha azul) y endocrina (flecha roja), desencadenando una compleja ruta de señalización que involucra, entre otras, a PKB, ERK1/2 y Ca^{2+} , regulando la expresión de genes relacionados con síntesis de proteínas y crecimiento celular.

IGF-1: Un mediador de la hipertrofia cardíaca

IGF-1 posee efectos metabólicos semejantes a la insulina aunque de menor intensidad. Sin embargo, IGF-1 es un potente factor de crecimiento involucrado en la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares. Después de la unión del IGF-1 a su receptor, este último se autofosforila en residuos de tirosina. Estos dominios fosforilados del receptor sirven para reclutar y fosforilar distintas proteínas, entre las que se incluyen a los sustratos

1 y 2 del receptor de insulina (IRS1 e IRS2). A su vez, los IRSs fosforilados interaccionan y reclutan otras proteínas citoplasmáticas específicas que contienen dominios de reconocimiento de tirosinas fosforiladas (SH2). IGF-1 induce hipertrofia en cardiomiocitos por aumento en la síntesis de proteínas contráctiles y masa total celular (Fig. 3), junto a un incremento del número de sarcómeros por activación de una intrincada red de señalización que se detalla a continuación.

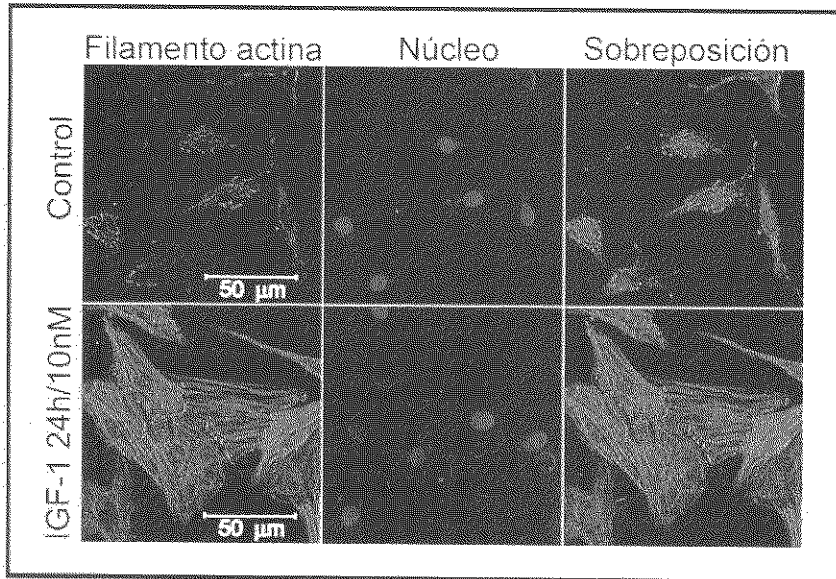


Figura 3. IGF-1 induce hipertrofia en cardiomiocitos. Se muestra un ensayo de inmunofluorescencia en cardiomiocitos para una situación control y otra estimulada con IGF-1 tal como se indica. En rojo se muestran los filamentos de actina constituyentes del sistema contráctil celular y en azul los núcleos. Las células tratadas con IGF-1 muestran una mayor cantidad de filamentos de actina estructurados y el área celular corresponde prácticamente al doble de la situación control.

Papel de la vía de PI3K en la hipertrofia inducida por IGF-1

La fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3-K) pertenece a una familia de enzimas con actividad lipido-quinasa vinculada a crecimiento, supervivencia y proliferación celular²⁵. PI3-K puede ser activada tanto por receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (TKR), como por receptores acoplados a proteína G (GPCRs)²⁵. La expresión de un mutante constitutivamente activo de PI3-K resulta en hipertrofia cardíaca en ratones²⁶. La expresión de un dominante negativo de PI3-K reduce significativamente la hipertrofia cardíaca en estos ratones. Uno de los principales blancos de PI3K es la proteína quinasa B (PKB) y en este mismo sentido, la sobreexpresión de esta quinasa es suficiente para inducir hipertrofia cardíaca²⁷.

Dos importantes mediadores de la hipertrofia cardíaca inducida por PI3-K/PKB son mTOR y la glicógeno

sintetasa quinasa-3 β (GSK-3 β)²⁵. Rapamicina, una droga inmunosupresora, se une a su receptor intracelular FKBP12 y este complejo se une posteriormente a mTOR, una proteína quinasa implicada en la regulación de la síntesis de proteínas. Rapamicina inhibe la actividad de mTOR, alterando la síntesis de proteína y el tamaño celular por inhibición de p70S6 quinasa y 4EBP1/eIF4E²⁸. De forma interesante, la rapamicina atenúa la hipertrofia cardíaca producida por la expresión de PKB constitutivamente activa²⁷. Además, rapamicina bloquea completamente la hipertrofia del cardiomiocito inducida por fenilefrina o angiotensina II²⁵. También se ha señalado que PKB fosforila directamente a GSK-3 β , la cual actúa como una vía antihipertrófica. Hay evidencia que vincula a GSK-3 β como un regulador negativo del desarrollo de hipertrofia cardíaca²⁹. GSK-3 es una familia de proteínas kinasas presente en todos los eucariotes³⁰. Existen dos isoformas

de GSK-3 en humanos, GSK-3 α (51 kDa) y GSK-3 β (47 kDa) y aunque ambas son expresadas en corazón, distintos estudios apuntan a la participación de GSK-3 β en la regulación de la hipertrofia cardíaca³⁰. GSK-3 β se localiza predominantemente en el citoplasma pero también se encuentra en el núcleo. Su localización subcelular cambia en respuesta a los estímulos³⁰. Una importante característica de GSK-3 β es el hecho de que es catalíticamente activa en células no estimuladas y su actividad se regula a nivel de expresión. Sin embargo, PKB es una kinasa identificada como un regulador río arriba de GSK-3 β , produciendo su fosforilación e inhibición del efecto antihipertrófica^{25,30}. El incremento de la actividad de GSK-3 β inhibe diversos procesos asociados a la hipertrofia cardíaca, incluyendo el aumento de la síntesis de proteínas y expresión de genes asociados a hipertrofia³¹. La sobreexpresión de la mutante GSK-3 β S9A, la cual no es fosforilada por PKB, inhibe la hipertrofia inducida por endotelina-1³². GSK-3 β regula la transcripción génica, síntesis de proteínas, organización del citoesqueleto y regula la hipertrofia cardíaca a través de múltiples mecanismos. GSK-3 β fosforila una amplia variedad de factores transcripcionales, entre los que se cuenta a NFAT, a través de las cuales regula la transcripción génica^{25,30}. GATA-4 es otro factor transcripcional blanco de GSK-3 β , el cual regula varios genes cardíacos e induce hipertrofia. La fosforilación de GATA-4 por GSK-3 β promueve su salida desde el núcleo e inhibe la transcripción dependiente de GATA-4³³. IGF-1 estimula la fosforilación de GSK-3 β en cultivos de cardiomiocitos, lo que produce una inhibición del efecto antihipertrófica de GSK-3 β ³⁴.

Papel de las MAPKs en la hipertrofia cardíaca dependiente de IGF-1

Factores claves en el desarrollo de hipertrofia cardíaca son las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), que corresponden a una serie de enzimas que regulan por fosforilación diversos sustratos involucrados en la transcripción de genes y la síntesis de proteínas³⁵. Las MAPKs se subdividen en cuatro subfamilias: Proteínas kinasas ERK 1/2, ERK-5, JNKs y p38-MAPKs³⁶. Estas tres últimas subfamilias son activadas por factores de crecimiento, hormonas y diversas formas de estrés químico o físico³⁶. Cada una de estas subfamilias tiene una columna vertebral integrada, al menos, por tres proteínas kinasas: MKKK, MEKs y MAPK que se activan secuencialmente por fosforilación, conformando lo que se denomina una cascada transduccional. ERKs, JNKs y p38-MAPKs son activadas por la fosforilación simultánea en residuos tirosina y treonina específicos³⁷. Estudios in vivo apoyan fuertemente la premisa de que la activación de ERK1/2 es suficiente para generar un fenotipo hipertrófico cardíaco³⁷. La sobreexpresión en ratones transgénicos de MEK1, la MAPK kinasa que activa a ERK 1/2, pero no a JNKs ni p38-MAPKs, resulta en hipertrofia cardíaca³⁸. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que IGF-1 activa la vía ERK1/2, vinculando este factor de crecimiento al desarrollo de hipertrofia en cultivos primarios de cardiomiocitos³⁹. Todos los parámetros hipertróficos son bloqueado por dominantes negativos de MEK1, inhibidores específicos de MEK1 (PD98059, U0126) y oligonucleótidos antisentido³⁷ (figura 4).

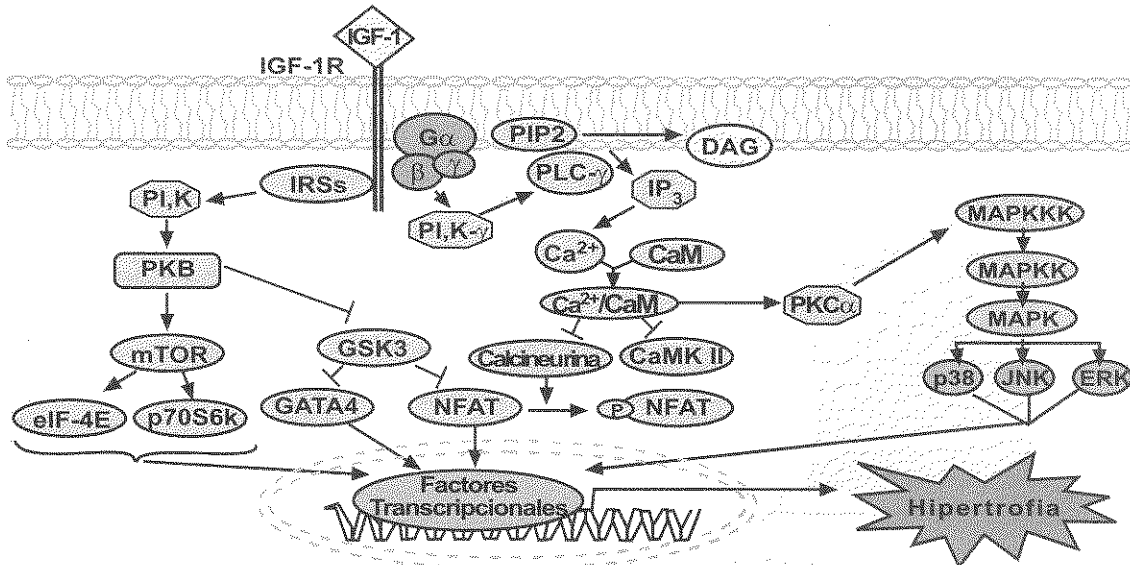


Figura 4. Eventos moleculares en el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Se muestra la transducción de señales prohipertrófica río abajo de la activación del IGF-1R. Estas vías regulan a algunos factores de transcripción involucrados en el desarrollo de la hipertrofia tales como GATA4, NFAT, p70S6K, etc. Las proteínas kinasas activadas por mitógenos p38, JNK y ERK, son capaces de viajar al núcleo y de esta manera regulan directamente múltiples factores de transcripción pro hipertrofos.

Papel del calcio y vías dependientes de este segundo mensajero en la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF-1

El Ca^{2+} es un segundo mensajero esencial en el control del crecimiento cardíaco y función contráctil. Así, anomalías en el manejo de los niveles intracelulares de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) se observan en distintas patologías cardíacas, incluidas la hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Durante el progreso de un estímulo depolarizante, una pequeña cantidad de Ca^{2+} entra al cardiomiocito a través de canales de calcio tipo L (LTCC). Esta entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular produce la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico (RS) a través de los canales de calcio receptores de rianodina (RyR), aumentando la concentración del $[Ca^{2+}]_i$ libre aproximadamente 10 veces^{40,41}. La unión de $[Ca^{2+}]_i$ a troponina C en el aparato contráctil inicia la sístole cardíaca. Para la relajación cardíaca (diástole), el $[Ca^{2+}]_i$ se remueve desde el citoplasma por recaptación hacia el RS a través de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) y por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), entre otros. La capacidad de SERCA de bombear Ca^{2+} al interior del RS es regulada por su interacción con fosfolamban (PLB), una pequeña proteína moduladora dentro de la membrana del RS. PLB no fosforilado inhibe la captación

de Ca^{2+} por SERCA. A su vez, el PLB fosforilado (por acción de proteína quinasa A) disminuye su actividad inhibitoria y permite un aumento en la actividad de SERCA y relajación cardíaca^{40,41}. En condriocitos, IGF-1 induce liberación de $[Ca^{2+}]_i$ desde el retículo endoplasmático, el cual es parcialmente bloqueado por inhibidores de PLC o pretratamiento con Toxina Pertusis (PTX)⁴². Nuestro Laboratorio ha descrito in vitro, por primera vez, que IGF-1 induce un rápido y transitorio aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en cardiomiocitos de rata. Este Ca^{2+} se libera desde el RS por un mecanismo dependiente de la producción de inositol trifosfato (IP3) y esencialmente independiente de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o de su liberación desde los reservorios intracelulares dependientes del receptor de rianodina (RyR)³⁹. Algunos estudios recientes han mostrado que IGF-1 activa una proteína G heterotrimérica en fibroblastos de rata tratados con toxina pertussis (TXP)⁴³. Nuestros datos también indican que el efecto del IGF-1 sobre los niveles del $[Ca^{2+}]_i$ en el cardiomiocito depende tanto de la actividad tirosina quinasa de su receptor como de una proteína G³⁹. Además, hemos descifrado que la vía transduccional IGF-1R/proteína G/PI3K/PLC/IP3/RIP3 media los efectos del IGF-1 sobre los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 5).

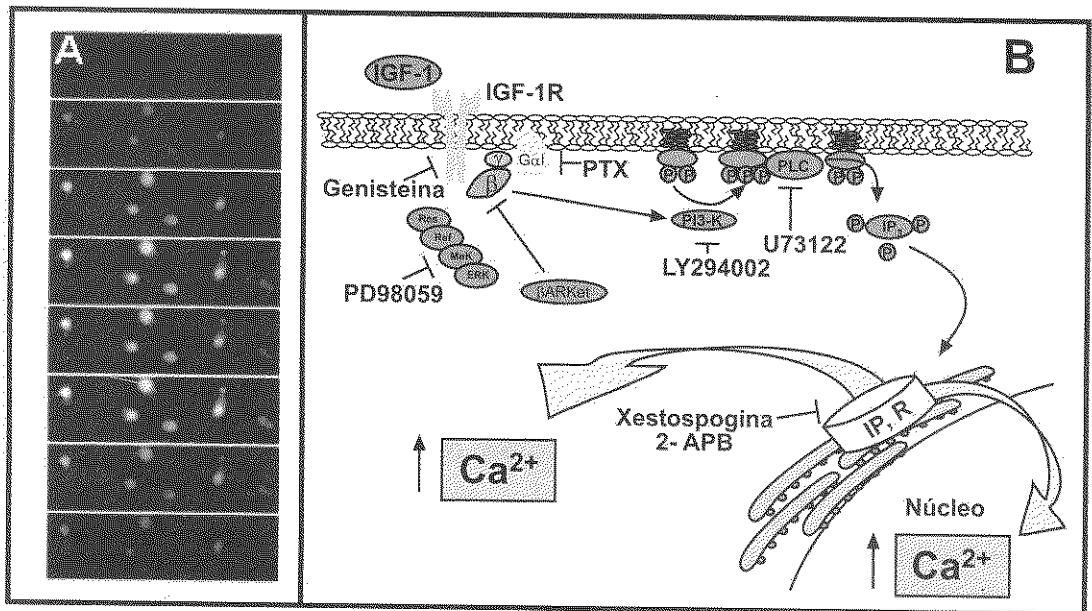


Figura 5. IGF-1 regula los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos. El panel A corresponde a una serie de imágenes en el tiempo, obtenidas por microscopía de epifluorescencia, donde se muestra que IGF-1 1nM produce un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos. El panel B muestra la vía de transducción involucrada en el aumento del $[Ca^{2+}]_i$. Esta señal fue inhibida en núcleo y citoplasma al preincubar las células con inhibidores del IGF-1R (genisteína), proteína G de tipo inhibitoria (TXP), PI3K (LY294002), PLC (U73122), IP₃R (xestospongina C y 2-APB) y por la expresión adenoviral de un péptido secuestrador de subunidad de proteína G (ARKct).

El aumento de los niveles de Ca^{2+} puede, a su vez, activar diversas proteínas transduccionales, entre ellas la proteína quinasa C (PKC). Esta es una familia de proteínas serina/treonina quinasa formada por 10 isoenzimas codificadas por diferentes genes. Las isoformas de PKC se clasifican en dependientes (cPKC), independientes de calcio (nPKC) y aquellas activadas por lípidos diferentes al diacilglicerol (aPKC). Las isoformas de PKC activadas se translocan a diferentes compartimentos subcelulares²⁵. Diversos estudios implican a varias isoformas de PKC en la patogénesis de la hipertrofia cardíaca. Por ejemplo, ratones transgénicos que sobreexpresan al isoforma PKC β en el corazón desarrollan hipertrofia cardíaca y muerte súbita⁴⁴. Además utilizando un inhibidor genético de PKC α , se mostró que esta enzima se requiere para la inducción de hipertrofia cardíaca *in vitro*³⁷. Tal como se muestra en la figura 4, IGF-1 activa a PKC α a través de la vía transduccional IGF-1R/PI3K/PLC. La primera evidencia de la participación del $[Ca^{2+}]_i$ en la hipertrofia cardíaca provino de la sobreexpresión de calmodulina (CaM), una de las principales proteínas intracelulares que une $[Ca^{2+}]_i$, producía una considerable hipertrofia ventricular en ratones transgénicos, mientras que la expresión de un dominante negativo generaba el efecto opuesto^{45,46}. Existen varias vías transduccionales dependientes de $[Ca^{2+}]_i$ que han sido involucradas en la génesis y desarrollo de la hipertrofia cardíaca; siendo una de las más estudiadas la vía de la fosfatasa calcineurina (Cn) y de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /CaM (CaMK).

Calcineurina (Cn) es una fosfatasa, cuya actividad depende del $[Ca^{2+}]_i$ y CaM⁴⁷. Esta enzima es esencialmente citoplasmática y está formada por dos subunidades, una catalítica (denominada A) que une Ca^{2+} /CaM y una reguladora (denominada B) que une $[Ca^{2+}]_i$. Fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina A (CsA) y FK-506 inhiben la actividad de Cn^{46,48}. El papel de Cn como transductor clave de la hipertrofia cardíaca provino de las observaciones iniciales de la exposición de cardiomiocitos a CsA o FK-506. Estos dos compuestos bloquearon el desarrollo de hipertrofia inducida por angiotensina II o fenilefrina⁴⁶. Cn tiene como uno de sus blancos al factor transcripcional NFAT3, quien al ser desfosforilado se transloca al núcleo, donde interacciona con el factor transcripcional GATA-4, controlando directamente la expresión de genes asociados al desarrollo de hipertrofia. La activación de NFAT3/GATA4 es bloqueada por CsA y FK-506^{36,46,48,49}.

Las CaMKs o proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM, también han sido vinculadas en la transducción de señales hipertroóficas en cultivos primarios de cardiomiocitos^{49,50}. Hasta la fecha se han descrito tres CaMKs, siendo altamente homólogas CaMKI y CaMKIV y la multimérica CaMKII. Las CaMKs fosforilan un amplio

repertorio de sustratos y son activadas por una cascada de proteínas quinasas de una manera muy similar a la de las MAPK²⁵. CaMKII es la isoforma predominante en corazón y está codificada por 4 genes, existiendo además otras variantes generadas por corte y empalme alternativo del RNA mensajero. La activación de las CaMKs induce la expresión de genes marcadores de hipertrofia y su inhibición por KN62 bloquea la hipertrofia⁵¹ (Fig. 4). Por otra parte, la expresión de una forma constitutivamente activa de CaMK IV en corazones de ratones transgénicos resulta en el establecimiento de una respuesta hipertrofica que progresa a disfunción cardíaca⁵¹. El blanco principal de CaMKs parece ser el factor transcripcional MEF-2C⁵². CaMKs estimula su actividad, disociándolo de su represor transcripcional HDAC que en su forma fosforilada no une a MEF-2, siendo así este último exportado al núcleo, permitiendo que se una a regiones promotoras específicas y aumente la expresión de genes relacionados con hipertrofia⁵⁰.

IGF-1: un prometedor regulador de la muerte del miocardio

En animales adultos, la pérdida de cardiomiocitos produce una permanente reducción del número de unidades funcionales del miocardio, constituyendo un factor importante en el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Por décadas se asumió que los cardiomiocitos morían exclusivamente por necrosis⁵³. Sin embargo hoy en día, se reconoce que la apoptosis juega un rol protagónico en la muerte de este tipo celular.

La apoptosis o muerte celular programada tipo I se define como un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución, regulado genéticamente y dependiente de energía, donde la propia célula comanda su propia destrucción, sin daño de células vecinas ni desarrollo de una respuesta inmune inflamatoria⁵⁴. La apoptosis ha sido implicada en diversas patologías cardíacas entre las que destacan cardiomiopatías dilatadas, insuficiencia cardíaca, infarto agudo al miocardio, displasia ventricular derecha y daño por isquemia/repercusión⁵⁵⁻⁵⁷. La inhibición de la pérdida de cardiomiocitos a través de la supresión de vías apoptóticas representa una potencial estrategia terapéutica para prevenir el desarrollo de la insuficiencia cardíaca⁵⁸.

Posterior a los estudios que documentaron al IGF-1 como un agente prohipertrofico, diversos investigadores mostraron que este factor de crecimiento también puede prevenir la pérdida de células cardíacas por disminución de la apoptosis inducida por diversos estímulos tales como privación de suero, exposición a doxorubicina, angiotensina II, hipoxia, estiramiento mecánico y estrés osmótico^{58,59}. Se ha demostrado en diferentes tejidos que IGF-1 previene la apoptosis y prolonga la supervivencia celular⁶⁰. Además

el receptor para IGF-1 se ha propuesto como un regulador central del ciclo de vida de mamíferos superiores⁶¹. La protección de los cardiomiocitos a través de la supresión de las vías de muerte celular puede representar una estrategia para prevenir la insuficiencia cardíaca. En este sentido, varios estudios experimentales e in vitro han demostrado que IGF-1 disminuye la apoptosis del cardiomiocito post-infarto al miocardio en el ratón⁶², en injuria por isquemia/reperfusión en la rata⁶³ y en modelos in vitro de cultivos de cardiomiocitos de rata⁵⁹. A diferencia de otros factores de crecimiento, IGF-1 previene la apoptosis del cardiomiocitos a concentraciones fisiológicas⁵⁹. El primer estudio que vinculó al IGF-1 con la apoptosis fue realizado por Buerke et al, quienes utilizando un modelo de isquemia/reperfusión, registraron que el marcado aumento en la fragmentación del DNA fue significativamente atenuado por acción del IGF-1⁶⁶. Diversas investigaciones posteriores han mostrado el efecto antiapoptótico del IGF-1 en células cardíacas expuestas a una amplia variedad de estímulos inductores de apoptosis. Dentro de estos modelos, el de ligación de la arteria coronaria de ratón ha establecido que la sobreexpresión transgénica del IGF-1 disminuyó tanto la muerte del miocardio como la dilatación ventricular⁵⁵. En el mismo sentido, en un modelo canino de insuficiencia cardíaca inducido por sobrecarga mecánica, IGF-1 redujo

el número de cardiomiocitos apoptóticos y aumentó la función contráctil⁵⁹. Entre distintos modelos in vitro, destaca el nuestro de inducción de apoptosis por estrés osmótico. Hemos observado que IGF-1 previene la apoptosis inducida por aumento de la osmolaridad externa. Además, este modelo nos ha ayudado a dilucidar tanto las vías de señalización involucradas en la estimulación y prevención de la apoptosis⁶⁴. Por ejemplo, IGF-1 estimula la fosforilación de ERK-1 y ERK-2 y la translocación de isoformas α , ϵ y δ de PKC hacia la membrana plasmática de cardiomiocitos expuestos a un aumento del estrés osmótico. Con el uso de inhibidores químicos selectivos y específicos para PKC y ERK se observó que sólo el bloqueo de la vía ERK antagonizó completamente el efecto antiapoptótico de IGF-1⁶⁴. El estudio de factores transcripcionales y su relación con el efecto antiapoptótico de IGF-1 también ha sido un tema abordado por nuestro Laboratorio, destacando el factor transcripcional CREB. Este factor es activado por estímulos pro- y antiapoptóticos e IGF-1 protege al cardiomiocito de la muerte por activación de CREB⁶⁵. La activación de las caspasa 3 y 9 fue atenuada por IGF-1. Sin embargo en aquellas células transducidas con un adenovirus que expresa una forma dominante negativa de CREB, el efecto protector del IGF-1 se anuló⁶⁵ (Fig. 6).

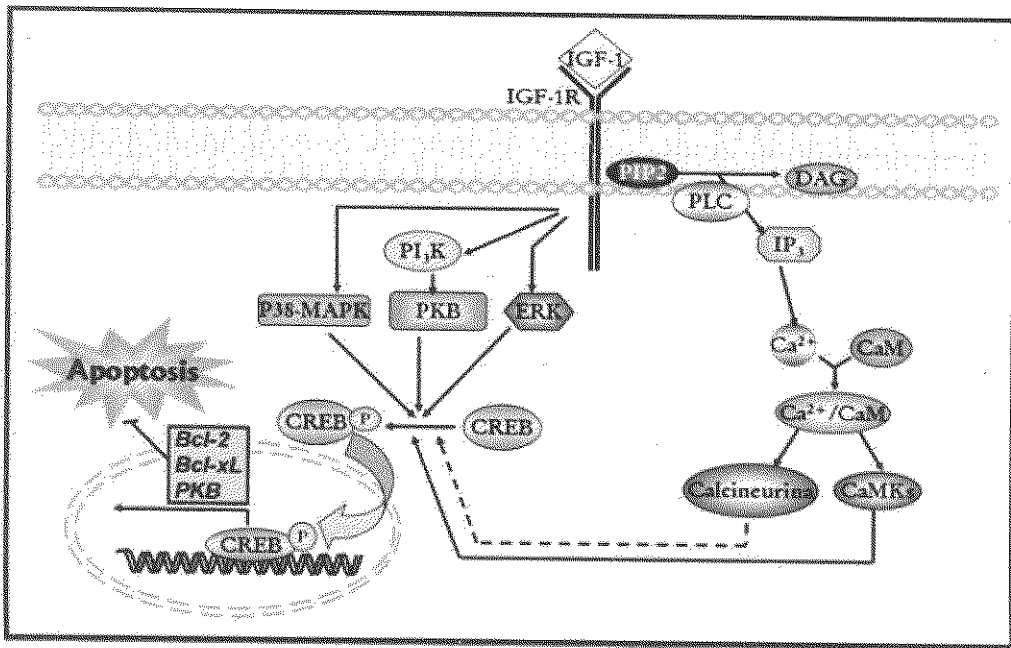


Figura 6. Efecto antiapoptótico del IGF-1 en músculo cardíaco. Se muestran las principales vías involucradas en el efecto protector de IGF-1 y su relación con el factor transcripcional CREB. Estas rutas producen la fosforilación de CREB que posteriormente migra al núcleo y activa la transcripción de genes antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL y PKB. Calcineurina es un importante regulador indirecto de la fosforilación de CREB.

El abuso de alcohol (etanol) es una de las causas de las cardiomiopatías. El etanol induce apoptosis en cultivos primarios de cardiomiocitos y se ha descrito que IGF-1 suprime parcialmente este efecto apoptótico, evidenciado a través de la atenuación parcial de la activación de caspasa 3, disminución de la fragmentación del DNA intranucleosomal y de los niveles de la proteína proapoptótica Bax⁵³. La inhibición de la apoptosis por IGF-1 también se ha asociado con un aumento en la expresión de integrantes de la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2⁶⁶.

IGF-1 y cardiomiopatía diabética

Los pacientes diabéticos presentan a menudo cardiomiopatías que pueden ocurrir sin alteraciones micro o macrovasculares. La cardiomiopatía diabética suele presentarse en pacientes diabéticos tipo I y II y es frecuente detectarla en pacientes diabéticos expuestos a estrés cardíaco adicional⁶⁷. El mecanismo responsable del desarrollo de la cardiomiopatía diabética prácticamente se desconoce. Numerosos cambios bioquímicos se han descritos en músculo cardíaco diabético, incluyendo una reprogramación en la expresión de proteínas contráctiles hacia un fenotipo fetal⁶⁸, disminución en la actividad de la bomba ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA)⁶⁹, aumento en la fosforilación de troponina I⁷⁰, incremento en la apoptosis del cardiomiocito⁷¹, aumento en la expresión y actividad de isoformas de PKCs⁷², alteraciones en el metabolismo de glucosa y expresión anormal de factores de crecimiento y sus receptores^{68,72}. Todas estas alteraciones en la homeostasis cardíaca pueden contribuir al desarrollo de disfunciones en el corazón pero la mayoría de estos eventos no parecen ser específicos de la cardiomiopatía diabética. Sin embargo, la variación de la densidad de IGF-1R en la superficie celular parece ser específica para la cardiomiopatía diabética. Datos recientes han mostrado una reducción de la concentración del IGF-1R cardíacos en modelos animales diabéticos⁷³, los cuales contrastan con las cardiomiopatías de origen isquémico e hipertrófico, donde se ha documentado un aumento en la expresión del IGF-1R en el músculo cardíaco^{74,75}. Dado que IGF-1 tiene una acción cardioprotectora, una reducción de la señalización del IGF-1R podría incrementar la vulnerabilidad celular a episodios de isquemia cardíaca y de esta manera jugar un papel clave en el desarrollo de cardiomiopatía diabética. Interesantemente se ha observado que una disminución de la densidad del IGF-1R en el músculo cardíaco se acompaña de una disminución de la proteína Hsp60, una proteína involucrada en la protección del cardiomiocito. La degradación del IGF-1R a través de la vía proteosomal también está aumentada en músculo cardíaco diabético⁷³. Estas investigaciones evidencian que una disminución de Hsp60 podría estar asociada a un mal

funcionamiento del sistema de transducción de señales del IGF-1R en corazones diabéticos⁷³.

Acción regenerativa del IGF-1 en el cardiomiocito

La visión tradicional de considerar a los cardiomiocitos como células terminalmente diferenciadas sin un potencial de regeneración⁷⁶ se ha ido modificando con la existencia de células totipotenciales cardíacas en humanos adultos que podrían originar nuevos cardiomiocitos^{77,78}. Estudios en humanos han demostrado una sub-población de cardiomiocitos que no son terminalmente diferenciados, estas células parecen ser capaces de reingresar al ciclo celular dando origen a una mitosis nuclear temprana después de un infarto al miocardio. El número de cardiomiocitos con nuevos ciclos celulares fue mayor en los bordes de un infarto que en aquellos lugares alejados de la injuria⁷⁹.

La prevalencia de hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardíaca congestiva aumenta con la edad, tanto en individuos sin hipertensión como en individuos con enfermedades cardiovasculares aparentes^{80,81}, los que presentan una extensa erosión de telómeros, senescencia celular y muerte de cardiomiocitos que caracterizan las afecciones cardíacas en edad avanzada⁸². Ahora bien, en autopsias a corazones humanos transplantados y no transplantados se ha confirmado la presencia de células miocárdicas mitóticas⁸³. En este estudio se encontró un aumento de 10 veces en el número de células mitóticas en corazones humanos provenientes de pacientes con trastornos isquémicos y cardiomiopatías dilatadas criptogénicas comparados con corazones normales⁸³. En pacientes con estenosis aórtica se encontró una intensa formación de nuevos cardiomiocitos resultantes de la transformación de células totipotenciales con marcadores moleculares de diferenciación⁸⁴. Su número incrementó más de 13 veces, lo que soporta la existencia de células totipotenciales cardíacas que se amplifican y forman un nuevo linaje de cardiomiocitos en respuesta a una sobrecarga de trabajo⁸⁴. Si estas células están permanentemente en el tejido cardíaco o son originadas en la médula ósea y llegan a este tejido desde la circulación es un tema de abierto debate^{85,86}. El trasplante cardíaco humano entre sexos ha sugerido un origen periférico de estas células, pues corazones femeninos transplantados en hombres presentan un significativo número de cardiomiocitos positivos al cromosoma Y⁸⁶.

Evidencias experimentales diversas han señalado al IGF 1 como un factor de crecimiento clave en la regeneración de los cardiomiocitos. Estudios en cultivo primario de cardiomiocitos de rata adulta indican que IGF-

1 activa la síntesis de DNA⁸⁷. Experimentos con ratones transgénicos para IGF-1 han demostrado que la división de células totipotenciales cardíacas es inducida vía IGF-1R, la cual se acompaña de un aumento en la actividad de la telomerasa y mantención funcional de las células totipotenciales cardíacas⁸⁸. Recientes estudios en humanos y animales han informado que la replicación del cardiomiocito podría ocurrir en condiciones fisiopatológicas dado que se ha observado que IGF-1 promueve la expresión de genes relacionados con el crecimiento, la replicación del DNA, la división mitótica nuclear de los cardiomiocitos y la división celular⁸⁹. Aunque el cardiomiocito podría eventualmente dividirse en el corazón adulto, la magnitud de esta regeneración está muy por debajo de la requerida para revertir la muerte post-injuria. Sin embargo en este tipo de patologías cardíacas, el IGF-1 se presenta como un actor central para mejorar y aumentar la reparación celular luego del daño cardíaco.

El hecho que los cardiomiocitos puedan regenerarse en respuesta a un aumento del estrés y que el IGF-1 parece ser un factor cardioprotector relevante han abrigado nuevas investigaciones para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardíacas.

Estudios clínicos de IGF-1 en terapia cardiovascular

La mortalidad por enfermedades cardiovasculares se eleva dos veces en pacientes con alguna deficiencia en el eje GH/IGF-1⁹⁰. Diversas evidencias epidemiológicas han señalado que una disminución de niveles circulantes de IGF-1 se asocian con un aumento de riesgo de infarto agudo al miocardio y aterosclerosis en arterias coronarias y carótidas⁹¹. El IGF-1 circula en la sangre unido a una de las seis proteínas denominadas IGFBP, mayoritariamente a IGFBP-3. Se ha estimado que menos del 1% del IGF-1 circulante está libre y biodisponible⁹². Las diversas IGFBPs pueden aumentar o disminuir los efectos del IGF-1 e incluso algunas pueden tener efectos biológicos independientes de este factor de crecimiento⁹².

Tanto estudios clínicos como experimentales han otorgado al IGF-1 un papel clave en el remodelado ventricular izquierdo e insuficiencia cardíaca⁹³. Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva tienen bajos niveles séricos de IGF-1 que correlacionan con la aparición de disfunción sistólica ventricular, caquexia, debilidad de la musculatura esquelética y con activación neuro-hormonal y de citocinas^{94,95}. La administración de IGF-1 mejora los índices de contractibilidad del ventrículo izquierdo⁹⁶. Investigaciones epidemiológicas muestran que el aumento en la incidencia de insuficiencia cardíaca congestiva propia de la edad podría atribuirse a la disminución progresiva de los niveles séricos de IGF-1 en el envejecimiento^{97,98}. Observaciones clínicas también han señalado que la

disminución de los niveles séricos de IGF-1 se asociaría a una disminución en el número de cardiomiocitos, acumulación de colágeno intersticial, fibrosis, reducción de la función cardíaca, menor respuesta de los receptores -adrenérgicos y disfunción endotelial. Todas estas alteraciones aumentan en pacientes mayores con insuficiencia cardíaca⁹⁹. La existencia de una relación inversa entre los niveles plasmáticos de IGF-1 y riesgo de insuficiencia cardíaca puede ser explicada ya sea por un efecto directo o indirecto de la hormona de crecimiento. El primero podría estar relacionado con la acción autocrina, paracrina y endocrina del IGF-1 en el corazón, produciendo la activación de múltiples vías transduccionales protectoras. En cambio la acción indirecta del IGF-1 podría estar asociada con sus efectos vasodilatadores¹⁰⁰. A nivel del endotelio vascular, también parece existir una relación inversa entre la concentración plasmática de IGF-1 y desarrollo de enfermedades coronarias. En dos series de estudios angiográfico se mostró que pacientes con bajos niveles plasmáticos de IGF-1 presentaron estenosis coronaria más severa^{101,102}. En pacientes ancianos se ha informado que niveles bajos de IGF-1 libre se asociarían con el desarrollo de placas ateromatosas en las carótidas pero no con un engrosamiento de la capa íntima-media de estas arterias¹⁰³. En una cohorte de pacientes hombres mayores, los niveles bajos del IGF-1 predijeron un elevado engrosamiento de la carótida íntima-media pero no de placas ateromatosas focalizadas¹⁰⁴. Estos datos en su conjunto sugieren que el mantenimiento de niveles óptimos de IGF-1 podría reducir el riesgo de insuficiencia cardíaca y desarrollo de otras patologías. En este contexto, futuras terapias con IGF-1 recombinante humano podrían ayudar a mantener niveles normales en pacientes mayores con riesgo cardiovascular. Sin embargo, altos niveles de IGF-1 se han asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de próstata, debido al marcado efecto antiapoptótico del IGF-1¹⁰⁵. Investigaciones recientes están estableciendo niveles óptimos de IGF-1 que confieran cardioprotección sin riesgo de desarrollar cáncer¹⁰⁶.

Referencias

1. FROESCH ER, BUERGI H, RAMSEIER EB, BALLY P, LABHART A 1963 Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest* 42:1816-1834.
2. DAUGHADAY WH, HALL K, RABEN MS, SALMON WD, JR., VAN DEN BRANDE JL, VAN WYK JJ 1972 Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235:107.
3. BLUNDELL TL, HUMBEL RE 1980 Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287:781-787.
4. RINDERKNECHT E, HUMBEL RE 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769-2776.
5. BRISSENDEN JE, ULLRICH A, FRANCKE U 1984 Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 310:781-784.
6. MULLIS PE, PATEL MS, BRICKELL PM, HINDMARSH PC, BROOK CG 1991 Growth characteristics and response to growth hormone therapy in patients with hypochondroplasia: genetic linkage of the insulin-like growth factor I gene at chromosome 12q23 to the disease in a subgroup of these patients. *Clin Endocrinol* 34:265-274.
7. ROTWEIN P 1991 Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5:3-18.
8. ADAMS TE, EPA VC, GARRETT TP, WARD CW 2000 Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050-1093.
9. DE MEYTS P, WHITTAKER J 2002 Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 1:769-783.
10. SIEBLER T, LOPACZYNSKI W, TERRY CL, CASELLA SJ, MUNSON P, DE LEON DD, PHANG L, BLAKEMORE KJ, MCEVOY RC, KELLEY RI. 1995 Insulin-like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of the distal long arm of chromosome 15. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3447-3457.
11. SEINO S, SEINO M, NISHI S, BELL GI 1989 Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:114-118.
12. LEROITH D, WERNER H, BEITNER-JOHNSON D, ROBERTS CT, JR. 1995 Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16:143-163.
13. FAVELYUKIS S, TILL JH, HUBBARD SR, MILLER WT 2001 Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* 8:1058-1063.
14. SCHAFFER L 1994 A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur J Biochem* 221:1127-1132.
15. CHRISTOFFERSEN CT, BORNFELDT KE, ROTELLA CM, GONZALES N, VISSING H, SHYMKO RM, TEN HOEVE J, GROFFEN J, HEISTERKAMP N, DE MEYTS P 1994 Negative cooperativity in the insulin-like growth factor-I receptor and a chimeric IGF-I/insulin receptor. *Endocrinology* 135:472-475.
16. Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LEROITH D, TORNELL J, ISAKSSON OG, JANSSON JO, OHLSSON C 1999 Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7088-7092.
17. YAKAR S, LIU JL, STANNARD B, BUTLER A, ACCILI D, SAUER B, LEROITH D 1999 Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7324-7329.
18. D'ERCOLE AJ, STILES AD, UNDERWOOD LE 1984 Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:935-939.
19. MATHEWS LS, ENBERG B, NORSTEDT G 1989 Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J Biol Chem* 264:9905-9910.
20. SACCA L, CITTADINI A, FAZIO S 1994 Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 15:555-573.
21. THORNER MO, VANCE ML 1988 Growth hormone, 1988. *J Clin Invest* 82:745-747.
22. FONCEA R, ANDERSSON M, KETTERMAN A, BLAKESLEY V, SAPAG-HAGAR M, SUGDEN PH, LEROITH D, LAVANDERO S 1997 Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272:19115-19124.
23. PAZ K, HEMI R, LEROITH D, KARASIK A, ELHANANY E, KANETY H, ZICK Y 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918.
24. JONES JI, CLEMMONS DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
25. FREY N, OLSON EN 2003 Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65:45-79.
26. SHIOI T, KANG PM, DOUGLAS PS, HAMPE J, YBALLE CM, LAWITTS J, CANTLEY LC, IZUMO S 2000 The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19:2537-2548.
27. SHIOI T, MCMULLEN JR, KANG PM, DOUGLAS PS, OBATA T, FRANKE TF, CANTLEY LC, IZUMO S 2002 Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 22:2799-2809.
28. FINGAR DC, SALAMA S, TSOU C, HARLOW E, BLENIS J 2002 Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16:1472-1487.
29. HARDT SE, SADOSHIMA J 2004 Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63:500-509.
30. HARDT SE, SADOSHIMA J 2002 Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90:1055-1063.
31. ANTOS CL, MCKINSEY TA, FREY N, KUTSCHKE W, MCANALLY J, SHELTON JM, RICHARDSON JA, HILL JA, OLSON EN 2002 Activated glycogen synthase-3 beta

- suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:907-912.
32. HAQ S, CHOUKROUN G, KANG ZB, RANU H, MATSUI T, ROSENZWEIG A, MOLKENTIN JD, ALESSANDRINI A, WOODGETT J, HAJJAR R, MICHAEL A, FORCE T 2000 Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 151:117-130.
 33. MORISCO C, SETA K, HARDT SE, LEE Y, VATNER SF, SADOSHIMA J 2001 Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276:28586-28597.
 34. SEIMI SK, SEINOSUKE K, TSUYOSHI S, TOMOMI U, TETSUAKI H, MIKI K, RYUJI T, KENJI I, MITSUHIRO Y 2004 Glycogen synthase kinase-3beta is involved in the process of myocardial hypertrophy stimulated by insulin-like growth factor-1. *Circ J* 68:247-253.
 35. BOGOYEVITCH MA 2000 Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 45:826-842.
 36. MOLKENTIN JD, DORN II GW 2001 Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63:391-426.
 37. BUENO OF, MOLKENTIN JD 2002 Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res* 91:776-781.
 38. BUENO OF, DE WINDT LJ, TYMITZ KM, WITT SA, KIMBALL TR, KLEVITSKY R, HEWETT TE, JONES SP, LEFER DJ, PENG CF, KITSIS RN, MOLKENTIN JD 2000 The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19:6341-6350.
 39. IBARRA C, ESTRADA M, CARRASCO L, CHIONG M, LIBERONA JL, CARDENAS C, DIAZ-ARAYA G, JAIMOVICH E, LAVANDERO S 2004 Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:7554-7565.
 40. OLSON EN 2004 A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med* 10:467-474.
 41. FREY N, MCKINSEY TA, OLSON EN 2000 Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 6:1221-1227.
 42. POIRAUDEAU S, LIEBERHERR M, KERGOSIE N, CORVOL MT 1997 Different mechanisms are involved in intracellular calcium increase by insulin-like growth factors 1 and 2 in articular chondrocytes: voltage-gated calcium channels, and/or phospholipase C-coupled to a pertussis-sensitive G-protein. *J Cell Biochem* 64:414-422.
 43. LUTTRELL LM, VAN BIESEN T, HAWES BE, KOCH WJ, TOUHARA K, LEFKOWITZ RJ 1995 G beta-gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J Biol Chem* 270:16495-16498.
 44. BOWMAN JC, STEINBERG SF, JIANG T, GEENEN DL, FISHMAN GI, BUTTRICK PM 1997 Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* 100:2189-2195.
 45. GRUVER CL, DEMAYO F, GOLDSTEIN MA, MEANS AR 1993 Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology* 133:376-388.
 46. OLSON EN, MOLKENTIN JD 1999 Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype? *Circ Res* 84:623-632.
 47. LAPOINTE MC, DESCHEPPER CF, WU JP, GARDNER DG 1990 Extracellular calcium regulates expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Hypertension* 15:20-28.
 48. RUSNAK F, MERTZ P 2000 Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.
 49. BRAZ JC, BUENO OF, DE WINDT LJ, MOLKENTIN JD 2002 PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol* 156:905-919.
 50. ZHANG T, BROWN JH 2004 Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63:476-486.
 51. ZHU W, ZOU Y, SHIOJIMA I, KUDO H, AIKAWA R, HAYASHI D, MIZUKAMI M, TOKO H, SHIBASAKI F, YAZAKI Y, NAGAI R, KOMURO I 2000 Ca2+/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275:15239-15245.
 52. PASSIER R, ZENG H, FREY N, NAYA FJ, NICOL RL, MCKINSEY TA, OVERBEEK P, RICHARDSON JA, GRANT SR, OLSON EN 2000 CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest* 105:1395-1406.
 53. CHEN DB, WANG L, WANG PH 2000 Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci* 67:1683-1693.
 54. HENGARTNER MO 2000 The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
 55. LI Q, LI B, WANG X, LERI A, JANA KP, LIU Y, KAJSTURA J, BASERGA R, ANVERSA P 1997 Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 100:1991-1999.
 56. BUERKE M, MUROHARA T, SKURK C, NUSS C, TOMASELLI K, LEFER AM 1995 Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8031-8035.
 57. ANVERSA P, OLIVETTI G, LERI A, LIU Y, KAJSTURA J 1997 Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:169-176.
 58. MORALES MP, GALVEZA, ELTIT JM, OCARANZA P, DIAZ-ARAYA G, LAVANDERO S 2000 IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem Biophys Res Commun* 270:1029-1035.
 59. WANG L, MA W, MARKOVICH R, CHEN JW, WANG PH 1998 Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 83:516-522.
 60. MATTHEWS CC, FELDMAN EL 1996 Insulin-like growth factor I rescues SH-SY5Y human neuroblastoma cells from hyperosmotic induced programmed cell death. *J Cell Physiol* 166:323-331.
 61. HÖLZENBERGER M, DUPONT J, DUCOS B, LENEUVE P, GELOEN A, EVEN PC, CERVERA P, LE BOUC Y 2003 IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress

in mice. *Nature* 421:182-187.

62. LI B, SETOGUCHI M, WANG X, ANDREOLI AM, LERI A, MALHOTRA A, KAJSTURA J, ANVERSA P 1999 Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circ Res* 84:1007-1019.
63. BUERKE M, MUROHARA T, SKURK C, NUSS C, TOMASELLI K, LEFER AM 1995 Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8031-8035.
64. FONCEA R, GALVEZ A, PEREZ V, MORALES MP, CALIXTO A, MELENDEZ J, GONZALEZ-JARA F, DIAZ-ARAYA G, SAPAG-HAGAR M, SUGDEN PH, LEROITH D, LAVANDERO S 2000 Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 273:736-744.
65. MALDONADO C, CEA P, ADASME T, COLLAO A, DIAZ-ARAYA G, CHIONG M, LAVANDERO S 2005 IGF-1 protects cardiac myocytes from hyperosmotic stress-induced apoptosis via CREB. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1112-1118.
66. PARRIZAS M, LEROITH D 1997 Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138:1355-1358.
67. FEIN FS 1990 Diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 13:1169-1179.
68. WANG PH, ALMAHFOUZ A, GIORGINO F, MCCOWEN KC, SMITH RJ 1999 In vivo insulin signaling in the myocardium of streptozotocin-diabetic rats: opposite effects of diabetes on insulin stimulation of glycogen synthase and c-Fos. *Endocrinology* 140:1141-1150.
69. TROST SU, BELKE DD, BLUHM WF, MEYER M, SWANSON E, DILLMANN WH 2002 Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51:1166-1171.
70. MALHOTRA A, REICH D, REICH D, NAKOUZI A, SANGHI V, GEENEN DL, BUTTRICK PM 1997 Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase C epsilon and phosphorylation of troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade. *Circ Res* 81:1027-1033.
71. FIORDALISO F, LERI A, CESSSELLI D, LIMANA F, SAFAI B, NADAL-GINARD B, ANVERSA P, KAJSTURA J 2001 Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 50:2363-2375.
72. WAY KJ, KATAI N, KING GL 2001 Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetes Med* 18:945-959.
73. SHAN YX, LIU TJ, SU HF, SAMSAMSHARIAT A, MESTRIL R, WANG PH 2003 Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 35:1135-1143.
74. REN J, SAMSON WK, SOWERS JR 1999 Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31:2049-2061.
75. FAZIO S, PALMIERI EA, BIONDI B, CITTADINI A, SACCA L 2000 The role of the GH-IGF-I axis in the regulation of myocardial growth: from experimental models to human evidence. *Eur J Endocrinol* 142:211-216.
76. SOONPAA MH, FIELD LJ 1998 Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83:15-26.
77. CAPOGROSSI MC 2004 Cardiac stem cells fail with aging: a new mechanism for the age-dependent decline in cardiac function. *Circ Res* 94:411-413.
78. ANVERSA P, KAJSTURA J 1998 Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83:1-14.
79. BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN SM, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P 2001 Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344:1750-1757.
80. LAKATTA EG, LEVY D 2003 Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 107:139-146.
81. LAKATTA EG, LEVY D 2003 Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 107:346-354.
82. CHIMENTI C, KAJSTURA J, TORELLA D, URBANEK K, HELENIAK H, COLUSSI C, DI MEGLIO F, NADAL-GINARD B, FRUSTACI A, LERI A, MASERI A, ANVERSA P 2003 Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res* 93:604-613.
83. KAJSTURA J, LERI A, FINATO N, DI LORETO C, BELTRAMI CA, ANVERSA P 1998 Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8801-8805.
84. URBANEK K, QUAINI F, TASCA G, TORELLA D, CASTALDO C, NADAL-GINARD B, LERI A, KAJSTURA J, QUAINI E, ANVERSA P 2003 Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10440-10445.
85. BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, KASAHARA H, ROTA M, MUSSO E, URBANEK K, LERI A, KAJSTURA J, NADAL-GINARD B, ANVERSA P 2003 Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763-776.
86. QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P 2002 Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346:5-15.
87. REISS K, CHENG W, PIERZCHALSKI P, KODALI S, LI B, WANG S, LIU Y, ANVERSA P 1997 Insulin-like growth factor-1 receptor and its ligand regulate the reentry of adult ventricular myocytes into the cell cycle. *Exp Cell Res* 235:198-209.
88. TORELLA D, ROTA M, NURZYNSKA D, MUSSO E, MONSEN A, SHIRAIISHI I, ZIAS E, WALSH K, ROSENZWEIG A, SUSSMAN MA, URBANEK K, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, ANVERSA P, LERI A 2004 Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 94:514-524.

89. ANVERSA P, NADAL-GINARD B 2002 Cardiac chimerism: methods matter. *Circulation* 106:e129-e131.
90. ROSEN T, BENGTTSSON BA 1990 Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 336:285-288.
91. BAYES-GENIS A, CONOVER CA, SCHWARTZ RS 2000 The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 86:125-130.
92. COLLETT-SOLBERG PF, COHEN P 1996 The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:591-614.
93. REN J, SAMSON WK, SOWERS JR 1999 Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31:2049-2061.
94. ANKER SD, VOLTERRANI M, PFLAUM CD, STRASBURGER CJ, OSTERZIEL KJ, DOEHNER W, RANKE MB, POOLE-WILSON PA, GIUSTINA A, DIETZ R, COATS AJ 2001 Acquired growth hormone resistance in patients with chronic heart failure: implications for therapy with growth hormone. *J Am Coll Cardiol* 38:443-452.
95. NIEBAUER J, PFLAUM CD, CLARK AL, STRASBURGER CJ, HÖOPER J, POOLE-WILSON PA, COATS AJ, ANKER SD 1998 Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol* 32:393-397.
96. DONATH MY, SUTSCH G, YAN XW, PIVA B, BRUNNER HP, GLATZ Y, ZAPF J, FOLLATH F, FROESCH ER, KIOWSKI W 1998 Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3177-3183.
97. MCMURRAY JJ, STEWART S 2000 Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83:596-602.
98. GOODMAN-GRUEN D, BARRETT-CONNOR E 1997 Epidemiology of insulin-like growth factor-I in elderly men and women. The Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiol* 145:970-976.
99. KHAN AS, SANE DC, WANNENBURG T, SONNTAG WE 2002 Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 54:25-35.
100. VECCHIONE C, COLELLA S, FRATTA L, GENTILE MT, SELVETELLA G, FRATI G, TRIMARCO B, LEMBO G 2001 Impaired insulin-like growth factor I vasorelaxant effects in hypertension. *Hypertension* 37:1480-1485.
101. Schuler-Luttman S, Monnig G, Enbergs A, Schulte H, BREITHARDT G, ASSMANN G, KERBER S, VON ECKARDSTEIN A 2000 Insulin-like growth factor-binding protein-3 is associated with the presence and extent of coronary arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:E10-E15.
102. SPALLAROSSA P, BRUNELLI C, MINUTO F, CARUSO D, BATTISTINI M, CAPONNETTO S, CORDERA R 1996 Insulin-like growth factor-I and angiographically documented coronary artery disease. *Am J Cardiol* 77:200-202.
103. JANSSEN JA, STOLK RP, POLS HA, GROBBEE DE, LAMBERTS SW 1998 Serum total IGF-I, free IGF-I, and IGFB-1 levels in an elderly population: relation to cardiovascular risk factors and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:277-282.
104. VAN DEN BELD AW, BOTS ML, JANSSEN JA, POLS HA, LAMBERTS SW, GROBBEE DE 2003 Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men. *Am J Epidemiol* 157:25-31.
105. CHAN JM, STAMPFER MJ, GIOVANNUCCI E, GANN PH, MA J, WILKINSON P, HENNEKENS CH, POLLAK M 1998 Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279:563-566.
106. PARKHOUSE WS, COUPLAND DC, LI C, VANDERHOEK KJ 2000 IGF-1 bioavailability is increased by resistance training in older women with low bone mineral density. *Mech Ageing Dev* 113:75-83.