

Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca

Juan Tamargo, Ricardo Caballero, Ricardo Gómez, Lucía Núñez, Miguel Vaquero y Eva Delpón

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España.

El óxido nítrico (NO) liberado por prácticamente todas las células del corazón ejerce múltiples efectos sobre la función cardíaca. Modula las respuestas inotrópicas y cronotrópicas, el flujo de entrada de Ca^{++} y el ciclo del Ca^{++} en el retículo sarcoplásmico, la transmisión autonómica, la frecuencia cardíaca, la respiración mitocondrial, el consumo miocárdico de O_2 y la eficiencia mecánica. El NO regula la contractilidad cardíaca en respuesta a la distensión e inhibe la relación fuerza-frecuencia y las respuestas a la estimulación β -adrenérgica. También mejora la distensibilidad ventricular y aumenta el trabajo latido en pacientes con miocardiopatía dilatada, y desempeña un importante papel en la fase tardía del preconditionamiento isquémico. Por último, el NO puede modular la actividad de los canales cardíacos, la arritmogénesis, la apoptosis y la función cardíaca en el miocardio insuficiente. Para realizar todas estas funciones, las NO sintetasas (NOS) se localizan en microdominios de los cardiomiocitos en íntima vecindad con las vías de señalización que modulan. Sin embargo, es necesario conocer mejor los mecanismos implicados en la regulación y la localización celular de las NOS, así como las vías no enzimáticas de síntesis del NO, su localización y su inactivación en diversas situaciones fisiopatológicas antes de que podamos trasladar las múltiples acciones del NO en una alternativa terapéutica.

Palabras clave: Óxido nítrico. Óxido nítrico sintetasas. Contracción miocárdica. Frecuencia cardíaca.

Effects of Nitric Oxide on Cardiac Function

The nitric oxide (NO) that is released from almost all cardiac cells exerts numerous effects on cardiac function. These include the modulation of cardiac inotropic and chronotropic responses, sarcolemmal calcium influx and sarcoplasmic reticulum calcium cycling, autonomic nerve transmission, heart rate, mitochondrial respiration, myocardial oxygen consumption, and myocardial energetics. NO regulates cardiac contractility in response to stretch, depresses the force-frequency relationship, and inhibits responses to β -adrenergic stimulation. Moreover, it improves ventricular distensibility and increases stroke work in patients with dilated cardiomyopathy, and it plays an important role in the late phase of preconditioning. Finally, NO can modulate cardiac ion channels, arrhythmogenesis, apoptosis, and cardiac function in the failing heart. In order to perform these numerous functions, nitric oxide synthases (NOS) are spatially confined to different cardiomyocyte microdomains in close vicinity to second-messenger pathways. However, before we can develop alternative therapeutic strategies based on the effects of NO, we need to learn more about the mechanisms that regulate NOS activity and that determine the subcellular location of NOS, as well as about nonenzymatic NO formation and the storage and inactivation of NO within different cardiac cells under various physiopathological conditions.

Key words: Nitric oxide. Nitric oxide synthases. Myocardial contraction. Heart rate.

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (NO), que puede ser producido por prácticamente todas las células del corazón, actúa como regulador paracrino, autocrino e intracrino de la

función cardíaca a través de acciones directas sobre los cardiomiocitos y de acciones indirectas, consecuencia de sus efectos vasculares¹⁻⁸. En el miocardio, el NO regula, entre otros procesos, el acoplamiento excitación-contracción, la frecuencia cardíaca, el tono vegetativo, la respiración mitocondrial (metabolismo energético), los procesos de hipertrofia y apoptosis, y la fase tardía del preconditionamiento isquémico (tabla 1). A escala vascular, el NO regula el tono vascular, la perfusión coronaria, la permeabilidad capilar y la agregación plaquetaria y, además, desempeña un importante papel en el control de la angiogénesis, la

Correspondencia: Dr. J. Tamargo.
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Avda. Complutense, sn. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: jtamargo@med.ucm.es

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina.
Akt: proteincinasa B.
ASK-1: *apoptosis signal-regulating kinase 1*
 $[Ca^{++}]_i$: concentración intracelular de calcio.
 Ca^{++} - $Ca^{++}M$: complejo Ca^{++} -calmodulina.
CE: células endoteliales.
MCD: miocardiopatía dilatada.
 $dP/dt_{máx}$: velocidad máxima de ascenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo.
GCs: guanilil-ciclasa soluble.
IC: insuficiencia cardíaca.
 $I_{Ca^{++}L}$: corriente lenta de entrada de Ca^{++} a través de los canales tipo-L.
LPS: lipopolisacárido.
 MVO_2 : consumo miocárdico de O_2 .
NA: noradrenalina.
NO: óxido nítrico.
NOS: óxido nítrico sintasa.
PDE: fosfodiesterasas.
PKA/G: proteincinasas A y G.
PTDVI: presión telediastólica del ventrículo izquierdo.
 $R\beta$: receptores β -adrenérgicos.
RFF: relación fuerza-frecuencia.
RM2: receptores muscarínicos-M2.
RS: retículo sarcoplásmico.
 $RyR2$: receptores/canales de calcio del retículo sarcoplásmico.
SERCA2a: ATP-asa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico.
VI: ventrículo izquierdo.
XO: xantinoxidasa.

inflamación y la proliferación celular vascular. La regulación de todos estos procesos es sumamente compleja y depende no sólo de las concentraciones de NO, sino también del compartimiento celular donde se esté generando y de la vía de señalización activada, la situación fisiopatológica analizada, el estado redox celular y la presencia de otros mediadores celulares (acetilcolina, noradrenalina, bradicinina, angiotensina, etc.)¹⁻⁸. En este artículo revisaremos las principales vías de síntesis del NO y sus vías de señalización y, a continuación, algunos de los efectos cardíacos del NO, haciendo especial mención de los que regulan el acoplamiento excitación-contracción. Las restantes acciones cardíacas pueden consultarse en revisiones recientes¹⁻⁸ y las vasculares son analizadas en otro artículo de este suplemento.

TABLA 1. Efectos cardíacos del óxido nítrico

Efectos inotrópicos positivos (dosis bajas) y negativos (dosis altas)
Modula la relación fuerza-frecuencia
Inhibe la respuesta inotrópica positiva a los agonistas β -adrenérgicos
Mejora la relajación/distensibilidad ventricular
Regula la actividad de los canales iónicos cardíacos
Modula el tono vegetativo cardíaco
Aumenta el tono vagal cardíaco
Inhibe el tono simpático cardíaco
Regula la frecuencia cardíaca y la conducción auriculoventricular
Regula la respiración mitocondrial y el consumo miocárdico de O_2
Estimula/inhibe la apoptosis cardíaca
Modifica el crecimiento, la hipertrofia y el remodelado cardíacos
Regula la fase tardía del preconditionamiento isquémico

SÍNTESIS CARDÍACA DE ÓXIDO NÍTRICO

Síntesis enzimática

En los cardiomiocitos, el NO es generado por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa: neuronal (NOS1), inducible (NOS2) y endotelial (NOS3)¹⁻³. NOS1 y NOS3 son constitutivas y se activan por el complejo Ca^{++} -calmodulina ($Ca^{++}M$), mientras que la NOS2 es inducible, Ca^{++} -independiente y produce NO a mayor velocidad que las otras NOS (NOS2; 105 nmol/s, NOS1 y NOS3, 96 y 16 nmol/s, respectivamente)⁹. Para que el NO pueda ejercer sus múltiples acciones cardíacas, las distintas NOS se expresan en determinados microdominios celulares y sintetizan NO en la proximidad de su vía de señalización celular^{1-3,6}. Ello reduce el radio de difusión del NO en los cardiomiocitos, evita su inactivación por radicales libres y mioglobina, y aumenta su disponibilidad. En la tabla 2 se resumen algunos factores que regulan la expresión/actividad de las tres NOS³.

NOS3

Se expresa en el endotelio vascular y endocárdico, así como en los cardiomiocitos, los monocitos y las plaquetas^{2,3}. En los cardiomiocitos se localiza en las caveolas del sarcolema y, en particular, de los túbulos T. En el miocardio humano predomina en el epicardio del ventrículo izquierdo (VI) y en la aurícula^{10,11}. En el hurón, su expresión es máxima en el epicardio del VI, en la aurícula derecha y en el nodo senoauricular, intermedia en la pared del ventrículo derecho y muy reducida en el endocardio del VI¹⁰. En el perro, la NOS3 se expresa 15 veces más en los microvasos que en las grandes arterias coronarias; en éstas, la máxima expresión se observa en la arteria circunfleja, seguida de la arteria coronaria derecha, la descendente anterior izquierda y la aorta¹².

La NOS3 presenta una doble acilación (miristoilación en Gly2 y palmitoilación en Cys15 y Cys 26) ne-

TABLA 2. Factores que regulan la actividad de las óxido nítrico sintasas cardíacas

NOS1 aumenta	Hsp90, calmodulina, HIF Hipoxia aguda y crónica Enalapril
NOS2 aumenta	Noradrenalina, isoproterenol Citocinas (IL-1 β , TNF α , INF γ , LPS) Hipoxia aguda y crónica, HIF Estrógenos, estatinas Hiperglucemia
NOS2 disminuye	Distensión Corticoides, bosentán, aldosterona, ciclosporina A, ácido retinoico
NOS3 aumenta	Akt, PKA, PKC, PKG, calmodulina, dinamina-2 Cizallamiento, distensión, Hsp90, estimulación cardíaca, ejercicio Isquemia aguda y crónica, monóxido de carbono, hipoxia aguda Acetilcolina, adenosina, angiotensina II, agonistas de receptores (β 1/2- adrenérgicos, AT1-angiotensina II, α 1A- adrenérgico y 5-HT2B) Bradicinina, estrógenos, histamina, insulina, serotonina, sustancia P Estatinas, ciclosporina A
NOS3 disminuye	Caveolinas 1 y 3, NOSTRIN, LDL, LPS, TNF α , radicales libres ADMA, PKC, endostatina, hipoxia crónica Hiperglucemia, productos de glucosilación avanzada, diabetes tipo 1 Corticoides, eritropoyetina, anfotericina, milrinona

ADMA: dimetilarginina asimétrica; HIF: factor de transcripción inducible por hipoxia; IL: interleucina; INF: interferón; NOS: óxido nítrico sintasa; PLS: lipopolisacáridos, TNF: factor de necrosis tumoral.

cesaria para su anclaje en las caveolas, donde interactúa con las caveolinas-1 (células endoteliales [CE]) y 3 (cardiomiocitos), que la inactivan¹³. En las caveolas se colocaliza con diversos receptores (β -adrenérgicos, M2-muscarínicos, BK2-bradicinina), enzimas (proteincinasa C, Rho A, rac) y canales (HCN4)³. Cuando un estímulo (p. ej., el aumento de la frecuencia cardíaca) o un agonista incrementan la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{++}]_i$) se forma un complejo Ca^{++} -calmodulina (Ca^{++} - $Ca^{++}M$) que desplaza la NOS3 de la caveolina-3 y la NOS3 recupera su actividad catalítica¹³ (fig. 1). Sin embargo, estos agonistas producen una rápida desensibilización (en minutos) de la NOS3 y el aumento de las concentraciones de NO disminuye la $[Ca^{++}]_i$ a través de la inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{++14} ; como consecuencia, ejercen un *feed-back* negativo sobre su propia síntesis. La NOS3 también puede activarse independientemente de la $[Ca^{++}]_i$, a través de la fosforilación por la proteína serina/treonina cinasa Akt. En las caveolas, la proteína del choque térmico Hsp90 facilita la disociación de la NOS3

de la caveolina-3 y su unión al complejo Ca^{++} - $Ca^{++}M$, y actúa como punto de unión entre la NOS3 y la Akt, lo que facilita la fosforilación y la activación de la NOS3¹⁵. Por el contrario, algunas proteínas (NOSIP-NOS3 *interactin protein*, NOSTRIN-NOS3 *traffic inducer*) interactúan con la NOS3 y la translocan a estructuras del citosol donde se inactiva.

Las concentraciones de caveolinas modulan los efectos cardíacos de la NOS3. Los ratones deficientes en caveolina-1 presentan una menor vasoconstricción en respuesta a la estimulación de los receptores α -adrenérgicos debido a la mayor liberación de NO formado por la NOS3¹⁶, así como una miocardiopatía dilatada con hipertensión pulmonar¹⁷; los deficientes en caveolina-3 presentan una miocardiopatía dilatada hipertrófica con activación de la vía de las proteincinasas reguladas por estímulos extracelulares ERK1/2¹⁸, acentuándose la miocardiopatía en los animales que carecen de ambas caveolinas¹⁹. Las concentraciones de caveolina-3 disminuyen en perros con miocardiopatía hipertrófica, lo que aumenta la actividad no sólo de la NOS3, sino también de la NOS1²⁰; por el contrario, en la insuficiencia cardíaca (IC) pueden aumentar las concentraciones de caveolina-3, lo que contribuye a disminuir la actividad de la NOS3. Las estatinas facilitan la interacción entre Hsp90 y NOS3 y aumentan la actividad de la NOS3, al disminuir los valores de caveolina-1 en las CE²¹ y los cardiomiocitos.

La principal regulación postranscripcional de la NOS3 tiene lugar a través de la fosforilación de la Ser1177, que aumenta su actividad. Éste es el punto de acción de las proteincinasas B (Akt), A (PKA), C (PKC) y G (PKG)^{3,15}. La fosforilación de Ser617 y Ser635 producidas por PKA y PKB también activa la NOS3, mientras que la fosforilación de Thre495 producida por PKC y PKA la inactiva²². La estimulación de las CE con histamina o sustancia P implica la desfosforilación de Thre495; ello facilita la unión en este ámbito de la $Ca^{++}M$, la posterior fosforilación de la Ser1177 y la activación de la NOS3²³.

NOS1

Se expresa en la aurícula, los nodos senoauricular y auriculoventricular, las arterias epicárdicas, los terminales nerviosos simpáticos y vagales, y las neuronas intracardíacas^{24,25}. También se ha identificado una variante de la NOS1 en la mitocondria (mtNOS o NOS α)²⁶. En el hurón, la NOS1 predomina en el *septum* y endocardio del VI¹⁰ y, en la rata, en las aurículas^{24,25}. En los cardiomiocitos, la NOS1 se localiza en el retículo sarcoplásmico (RS), en la proximidad del receptor para rianodina (RyR2) y, por tanto, de los canales de Ca^{++} tipo-L, lo que sugiere que la NOS1 podría regular los flujos de Ca^{++} en ambas estructuras^{1,6,27}. La NOS1 contiene un dominio PDZ que la permite unirse a la caveolina-3 y a la ATP-asa Calcio-dependiente del sarcolema

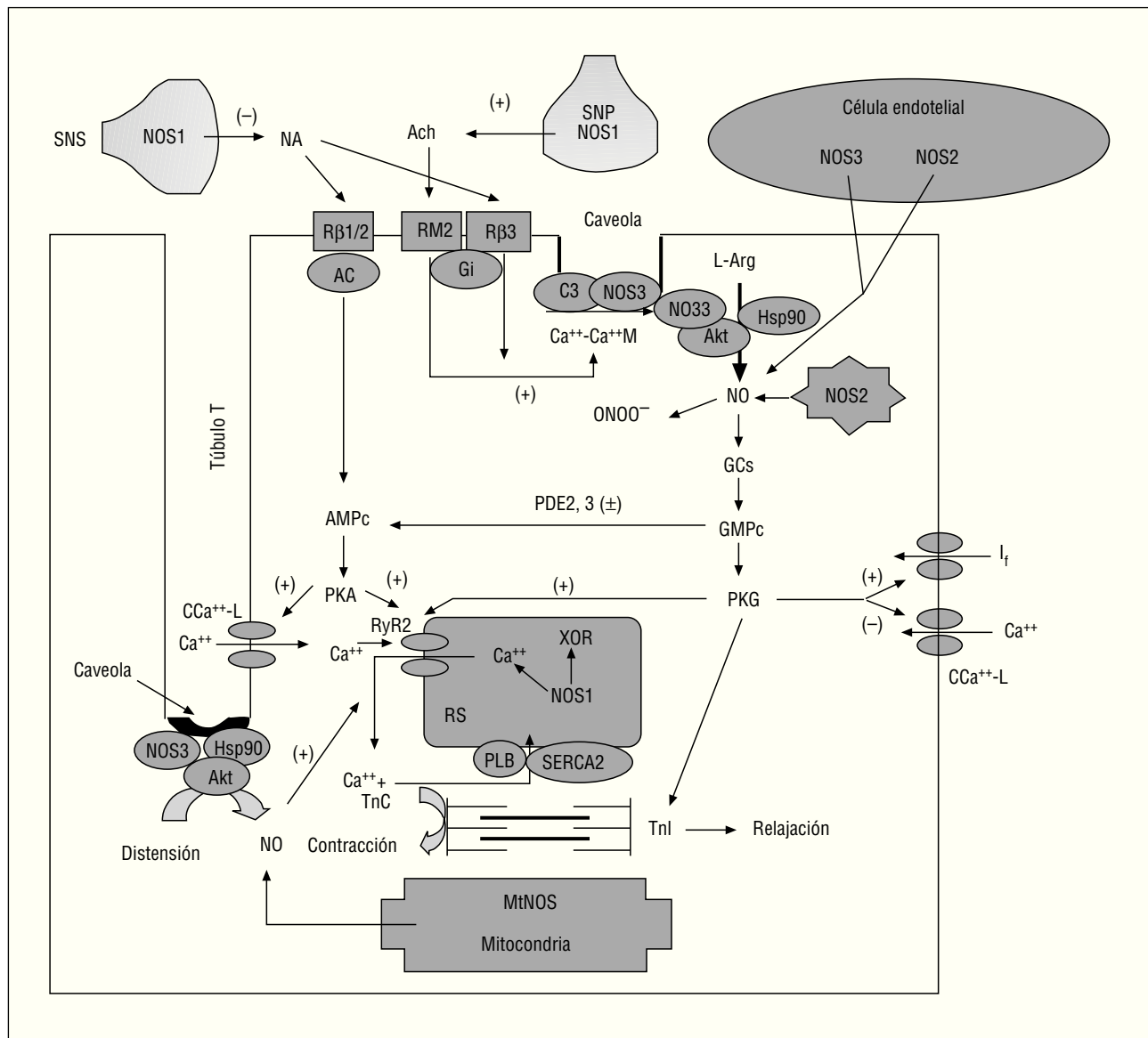


Fig. 1. Mecanismo de acción del óxido nítrico en los cardiomiocitos.

AC: adenil ciclasa; ACh: acetilcolina; Akt: proteínas B; C3: caveolinas-3; $[Ca^{++}]$: concentración intracelular de calcio; $Ca^{++}-Ca^{++}M$: complejo Ca^{++} -calmodulina; $CCa^{++}-L$: canales de calcio tipo L; GCs: guanil ciclasa soluble; G_i : proteína G inhibidora; Hsp: proteínas del choque térmico; I_f : corriente marcapaso de la célula cardíaca; mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial; NA: noradrenalina; NOS1: óxido nítrico sintasa neuronal; NOS2: óxido nítrico sintasa inducible; NOS3: óxido nítrico sintasa; $ONOO^-$: peroxinitrito; PDE: fosfodiesterasas; PKA/G: proteínas A y G; PLB : fosfolambano; $R\beta$: receptores β -adrenérgicos; $RM2$: receptores muscarínicos-M2; RS: retículo sarcoplásmico; $RyR2$: receptores/canales de calcio del retículo sarcoplásmico; $SERCA2a$: ATP-asa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico; SNP/SNS: terminales nerviosos parasimpáticos (vaginales) y simpáticos cardíacos; TnC/I: troponina C e I; XO: xantinoxidasa.

o formar un complejo con la sinaptosina I y una proteína adaptadora (CAPON) en los terminales nerviosos cardíacos. La fosforilación de la Ser847 de la NOS1 por una proteínas dependiente de $Ca^{++}-Ca^{++}M$ inhibe la síntesis de NO.

NOS2

En corazones normales humanos, la NOS2 está ausente. Sin embargo, las citocinas (interleucinas $[IL-1\beta, IL-6]$, factor de necrosis tumoral $[TNF] \alpha$, interferón

$[IFN] \gamma$) y el lipopolisacárido (LPS) inducen su expresión en el septo y el epicardio del VI, el endotelio endocárdico y vascular, las células inflamatorias (macrófagos), los fibroblastos y las células musculares lisas vasculares¹¹. En cardiomiocitos tratados con LPS o citocinas, el aumento de las concentraciones de ARNm de la NOS2 y la disminución de la contractilidad cardíaca son máximos al cabo de 6 h y, en ocasiones, la inducción de la NOS2 no sólo disminuye la contractilidad, sino que puede inducir la necrosis y la apoptosis cardíaca. La inducción de la NOS2 se inhibe con éste-

res de forbol y bisindolilmaleimida, lo que sugiere la participación de la PKC¹¹. En ratas en las que se realiza un trasplante cardíaco alogénico, la inducción de la NOS2 es máxima al cabo de 2 semanas y acompaña a la apoptosis cardíaca y al rechazo del trasplante, mientras que la inhibición selectiva de la NOS2 con aminoguanidina mejora la contractilidad cardíaca y aumenta la supervivencia del trasplante²⁸. La expresión de la NOS2 aumenta en modelos experimentales de isquemia/reperfusión, en el corazón de atleta y en pacientes con sepsis, miocardiopatías (dilatada [MCD], inflamatoria o periparto, pero no en la isquémica o valvular), respuesta inflamatoria sistémica o IC, observándose que la expresión de NOS2 en biopsias endomiocárdicas se relaciona con disfunción ventricular sistólica/diastólica en la ecografía^{1-3,29-31}. La actividad de la NOS2 aumenta con el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) o la activación de la PKC, lo que sugiere que el aumento en los valores de catecolaminas o de angiotensina II podría inducir la expresión de la NOS2 en el miocardio del paciente con IC.

Síntesis no enzimática del óxido nítrico

El hallazgo de que los valores de NO aumentan durante la isquemia experimental incluso tras inhibir las NOS sugiere la presencia de otras vías de síntesis del NO. En un medio ácido (isquemia), los nitritos forman ácido nitroso (HNO₂), que puede reaccionar con nitritos o un donador de electrones para formar trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) que, a su vez, puede producir NO. De hecho, la infusión de nitritos aumenta el flujo sanguíneo en la arteria braquial antes y durante el ejercicio, incluso tras la inhibición de las NOS³², lo que demuestra que los nitritos no sólo representan el principal producto de la oxidación del NO, sino también un importante depósito de NO. La xantinoxidasa (XO) del endotelio vascular también puede reducir los nitritos/nitratos a NO, particularmente en presencia de isquemia. Por último, los nitritos pueden reaccionar con la desoxihemoglobina para constituir una forma nitrosilada y S-nitrosohemoglobina, generándose NO en esta reacción.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

Dos son las principales vías de señalización del NO: la producción de guanosín-3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc) y la S-nitrosilación de grupos tioles proteínicos, que están moduladas, respectivamente, por la fosfodiesterasa 5 (PDE5) que se encuentra en las caveolas y la formaldehído deshidrogenada dependiente de glutatión.

El NO se une a la porción hemo de la guanilil ciclase soluble (GCs), a la que activa y aumenta la producción de GMPc que, a su vez, activa a la proteína cinasa G (PKG) y modula la actividad de diversas fosfodies-

terazas (PDE)^{1,11,33,34} (fig. 1). A bajas concentraciones de NO (rango nM), el GMPc inhibe la PDE3, con el consiguiente aumento en los valores de AMPc, que activan la PKA y la corriente de entrada de Ca⁺⁺ a través de los canales L de la membrana (I_{Ca++L})³⁵. Recientemente se ha propuesto que el aumento de AMPc podría también ser independiente de la vía GMPc e implicar la activación directa de las proteínas G³⁶. A mayores concentraciones de NO (rango μmol/l), la PKG inhibe la I_{Ca++L} y fosforila la troponina I, disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos al Ca⁺⁺ y la formación de enlaces cruzados durante la diástole^{1,11,37}. A estas concentraciones el NO podría también inhibir los RyR2.

La S-nitrosilación está asociada con la capacidad del NO para reaccionar con grupos tiol del aminoácido cisteína presentes en diversas proteínas implicadas en el acoplamiento excitación-contracción³⁸. La S-nitrosilación de los canales de Ca⁺⁺ tipo L³⁵ y RyR2^{27,39} modula su actividad dependiendo del estado redox celular. En cardiomiocitos aislados, el S-nitrosoglutation aumenta la amplitud de la I_{Ca++L}³⁵ y puede incrementar³⁹ o inhibir la probabilidad de apertura del canal RyR2⁴⁰. Es decir, el NO controla la actividad de los canales de Ca⁺⁺ tipo-L y RyR2 a través de ambas vías de señalización, la PKG y la S-nitrosilación.

EFFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA CONTRACTILIDAD CARDÍACA

Contractilidad basal

En corazones animales y humanos, el NO produce un efecto bifásico que puede reproducirse con donadores de NO (NO exógeno) y por el NO liberado desde las CE coronarias con bradicinina y sustancia P^{1,32,41-44}. A concentraciones submicromolares, el NO aumenta la contractilidad y los transientes celulares de Ca⁺⁺^{33,34}. Este efecto implica un aumento de la I_{Ca++L} secundario a la inhibición de la PDE3 producida por el GMPc, que activa la vía AMPc-PKA y fosforila el canal³⁵, aunque también podría participar la NOS1 a través de la activación de los canales RyR2^{27,39}. La disminución de la contractilidad podría deberse a la activación de la vía NOS3-GMPc-PKG, que fosforila la troponina I y disminuye su sensibilidad por el Ca⁺⁺^{2,33,45,46}, y a la inhibición de la I_{Ca++L} producida por la NOS1⁴⁷. De hecho, en miocitos ventriculares de rata transfectados con la NOS3 aumenta la contracción basal⁴⁸, mientras que los ratones que sobreexpresan 90 veces la NOS3 cardíaca presentan una reducción de la contracción basal⁴⁶. Por otro lado, los inhibidores selectivos de la NOS1 o en ratones NOS1^{-/-} aumentan la I_{Ca++L}, el contenido de Ca⁺⁺, su liberación a través de los canales RyR2 del RS y la contractilidad basal^{1,6,7,47,48}. Sin embargo, en ratones NOS1^{-/-}, NOS2^{-/-} o NOS3^{-/-} la contractilidad basal no se modifica (o incluso aumenta en

TABLA 3. Efectos inotrópicos, lusitrópicos y cronotrópicos del óxido nítrico en corazones en ausencia (basal) o tras estimulación de los receptores β -adrenérgicos (ER β A) en ratones que carecen de NOS1, NOS2 y NOS3

Modelo	Inotropismo		Lusitropismo		Cronotropismo	
	Basal	ER β A	Basal	ER β A	Basal	ER β A
NOS1 ^{-/-}	=/ $\uparrow$	=/ $\uparrow$ / $\downarrow$	=/ $\downarrow$	=	=/ $\uparrow$	
NOS2 ^{-/-}	=	=	=	=	=	
NOS3 ^{-/-}	=/ $\uparrow$	=/ $\uparrow$	=	$\uparrow$	=/ $\uparrow$ / $\downarrow$	=

NOS: óxido nítrico sintasa.
Modificada de Massion et al⁷.

los NOS1^{-/-}) (tabla 3)^{1,6,24,47,49}. Ello es debido a que en estos modelos se encuentran presentes varios factores de confusión: la producción de NO por otras NOS no modificadas, un aumento en las concentraciones de péptidos natriuréticos auriculares que activan el GMPc y la hipertensión que desarrollan los ratones NOS3^{-/-}, que puede producir adaptaciones estructurales típicas del fenotipo hipertrófico (rarefacción vascular, cambios en los depósitos intracelulares de Ca⁺⁺)^{1,7}.

Modulación de la contracción cardíaca estimulada

A continuación analizaremos los efectos del NO sobre tres mecanismos que en condiciones fisiológicas aumentan la contractilidad cardíaca durante el ejercicio: el aumento de la frecuencia cardíaca (relación fuerza-frecuencia [RFF]), la distensión de los miocitos cardíacos y la estimulación de los receptores β -adrenérgicos.

Relación fuerza-frecuencia

En cardiomiocitos de rata estimulados a frecuencias crecientes aumenta la [Ca⁺⁺]_i y la producción de NO, que disminuye la amplitud de las contracciones y aplanan la RFF³⁷. Estos efectos están mediados a través la vía NOS3-PKG, que fosforila la troponina I y desensibiliza las proteínas contráctiles al Ca⁺⁺, ya que se reproducen con 8-bromo-GMPc (un activador de la PKG) y se bloquean con inhibidores de la NOS³⁷. Sin embargo, en voluntarios sanos o en pacientes con MCD, la administración intracoronaria de un inhibidor de la NOS (L-NMMA) no modifica la RFF⁴³. La NOS1 es necesaria para mantener la RFF, ya que los ratones NOS1^{-/-} presentan una RFF plana, mientras que los ratones NOS3^{-/-} presentan una RFF^{7,47,49} similar a la de los ratones NOS3^{+/+}. La RFF plana en los ratones NOS1^{-/-} se acompaña de una reducción en los transientes de Ca⁺⁺ y en los depósitos de Ca⁺⁺ del RS a frecuencias rápidas⁴⁹. Ello podría deberse a que los depósitos de Ca⁺⁺ del RS no son capaces de rellenarse a frecuencias rápidas porque disminuye la recaptación de Ca⁺⁺ y/o aumenta la li-

beración de Ca⁺⁺ desde el RS. Sin embargo, el hallazgo de que en estos ratones disminuye el cociente fosfolambano/ATP-asa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico o SERCA2a (la actividad de la SERCA2a aumenta y la del fosfolambano disminuye) hace suponer que la reducción de los depósitos de Ca⁺⁺ sería debida a un aumento de su salida a través de los canales RyR2 a frecuencias rápidas⁴⁹.

Distensión cardíaca

La distensión mecánica de los cardiomiocitos fosforila la Ser1179 de la NOS3 a través de la Akt y aumenta la liberación de NO y la contractilidad cardíaca³⁴ (fig. 1). Este efecto inotrópico del NO desaparece en ratones NOS3^{-/-}, es independiente del GMPc (no se bloquea por ODQ, un inhibidor de la guanilil ciclasa soluble [GCs]) e implica una mayor liberación de Ca⁺⁺ a través de los canales RyR2 del RS³⁴. Por tanto, el NO podría participar en el aumento de la contractilidad que se produce para compensar el aumento del volumen telesistólico y la disminución del volumen por latido producidos al aumentar la poscarga del VI (efecto Anrep).

Estimulación β -adrenérgica

La NOS1 y la NOS3 se activan al incrementar la [Ca⁺⁺]_i, algo que sucede al aumentar la frecuencia cardíaca³⁷ o tras la administración de catecolaminas^{1,11}. La NOS3 inhibe la respuesta inotrópica máxima producida por las catecolaminas en modelos animales y en el hombre^{1-4,11,50}, mientras que la I_{Ca++L} y la contractilidad en respuesta al isoproterenol aumentan tras la administración de un inhibidor de la NOS y en cardiomiocitos de ratones NOS1^{-/-} y NOS3^{-/-} o tras la inhibición de la NOS1^{1,2,25,47,51,52} (tabla 3). Más aún, la respuesta inotrópica del isoproterenol se inhibe en ratones NOS3^{-/-} en los que se restaura la expresión de la NOS3⁵³ y tras la sobreexpresión de la NOS3 cardíaca, lo que confirma el efecto antiadrenérgico de la NOS3⁵⁴. La discrepancia entre la ausencia de potenciación β -adrenérgica observada en algunos ratones

NOS3^{-/-} y la hallada en presencia de inhibidores no específicos de la NOS sugiere que la NOS1 también podría atenuar el inotropismo β -adrenérgico.

Clásicamente se creía que la NOS3 contrarrestaba el efecto inotrópico positivo de las catecolaminas por 3 mecanismos (fig. 1): *a*) la inhibición de la $I_{Ca^{++L}}$ ³⁵, ya sea a través de la una fosforilación dependiente de la PKG⁵⁵ o por aumentar la actividad de la PDE 3 sensible al GMPc que hidroliza el AMPc y disminuye sus concentraciones intracelulares⁵⁶; *b*) la fosforilación de la troponina I por la PKG y la PKA, que disminuye su sensibilidad por el $Ca^{++42,45}$, y/o *c*) el bloqueo de los canales RyR2⁴⁰. A su vez, la inhibición producida por la NOS1 implicaría la inhibición de la $I_{Ca^{++L}}$ ⁴⁷; también se ha propuesto que la NOS1 inhibe los RyR2 y la liberación de Ca^{++} desde el RS³⁹ aunque, en ocasiones, puede activar los RyR2⁶.

Sin embargo, hoy día se cree que es la activación de los receptores β -adrenérgicos (R β 3) la causante de la activación de la NOS3 y de la producción de NO que inhibe el aumento de contractilidad producida por la estimulación simpática, ya que: *a*) la estimulación de los R β 3 reproduce efectos inotrópicos negativos del NO en el corazón humano⁵⁷; *b*) el NO no inhibe el aumento de la contractilidad producido por la estimulación β -adrenérgica en ratones que carecen de R β 3⁵²; *c*) el BRL37344, un agonista de los R β 3, produce un efecto inotrópico negativo que desaparece en ratones NOS3^{-/-} (no en los NOS1^{-/-})⁶, y *d*) los ratones NOS3^{-/-} o deficientes en R β 3 muestran una potenciación de las respuestas inotrópicas y cronotrópicas positivas a las catecolaminas. La estimulación de la vía R β 3-NO puede tener implicaciones en la IC. En esta situación aumenta la expresión de los R β 3⁵⁸ lo que, unido a la disminución de los R β 1, actuaría como un mecanismo protector frente a una excesiva estimulación simpática, que incrementa la $[Ca^{++}]_i$ y el consumo miocárdico de O_2 (MVO₂) en estos pacientes.

EFFECTO SOBRE LA RELAJACIÓN CARDÍACA

La NOS3 acelera la relajación, aumenta la longitud de los cardiomiocitos en diástole y desplaza la curva longitud pasiva-tensión hacia la derecha; además, antagoniza (no potencia) el efecto lusitrópico producido por las catecolaminas, observándose que los ratones NOS3^{-/-} muestran una mayor relajación en presencia de catecolaminas^{1,7,33,51}. La mejoría de la distensibilidad ventricular también ha sido demostrada en corazones humanos normales, en modelos de IC y en pacientes con MCD o estenosis aórtica^{4,59}. La mejoría de la relajación ha sido atribuida a la fosforilación de la troponina I producida por la PKG, que inhibe la formación de enlaces cruzados durante la diástole³³. El aumento de la distensibilidad ventricular podría también deberse al NO liberado desde el endotelio. De hecho, la bradicinina y la sustancia P aumentan las concentra-

ciones de GMPc en los cardiomiocitos y aceleran la relajación ventricular, efectos que se bloquean tras eliminar el endotelio endocárdico.

En cardiomiocitos aislados y en corazones aislados, las concentraciones de NO fluctúan durante el ciclo cardíaco, alcanzando concentraciones máximas (rango μ mol/l) al final de la diástole, justo lo contrario de lo que sucede con la $[Ca^{++}]_i$ ^{60,61}. La liberación de NO disminuye cuando lo hace la precarga y aumenta marcadamente por la noradrenalina, lo que sugiere que el NO podría desempeñar un papel importante en el acoplamiento excitación-contracción. Así, cuando aumenta la precarga, la mayor liberación de NO mejoraría la distensibilidad ventricular y normalizaría la precarga. El análisis de las contracciones isométricas demuestra que el NO no modifica la velocidad de acortamiento cardíaco, pero reduce el pico tensional y acelera la relajación⁴². Este acortamiento de la contracción podría mejorar la perfusión coronaria, especialmente a frecuencias rápidas, que acortan la diástole y el tiempo de perfusión coronaria.

En pacientes sometidos a un cateterismo cardíaco (fig. 2), la infusión intracoronaria de nitroprusiato sódico (un donador de NO) o de sustancia P (que aumenta la liberación de NO por las CE) no modifica la fase de ascenso de la presión sistólica del VI, pero disminuye la presión máxima al final de la sístole, y la presión telediastólica del VI (PTDVI) y mejora la distensibilidad ventricular, desplazando la relación presión-volumen al final de la diástole hacia abajo y hacia la derecha^{4,59}, lo que en pacientes con MCD se acompañaba de un aumento del volumen por latido del VI⁴. Tanto la reducción de la PTDVI izquierda como el aumento del volumen por latido indican que el NO no deprime la contractilidad cardíaca en voluntarios sanos y en pacientes con MCD.

En pacientes sin cardiopatía isquémica, la administración intracoronaria de L-NMMA reduce la velocidad máxima de ascenso de la presión desarrollada por el VI ($dP/dt_{máx}$), pero no modifica la relajación isovolumétrica, la PTDVI o la frecuencia cardíaca, y en pacientes con MCD, en los que aumenta la expresión de la NOS2 en las biopsias intramiocárdicas, el L-NMMA mejora la relajación, pero no modifica la $dP/dt_{máx}$ o la PTDVI⁴³. Estos resultados indican que el NO no ejerce efectos inotrópicos y mejora la relajación ventricular en pacientes con corazón normal o MCD. Igualmente, en pacientes con MCD a los que se infundía dobutamina, la administración intracoronaria de donadores de NO o de sustancia P produce una ligera reducción de la $dP/dt_{máx}$, pero ello no implica un deterioro hemodinámico, ya que no se altera el volumen final sistólico y disminuye la PTDVI^{4,59,62,63}. Resultados similares han sido observados en pacientes con MCD durante la infusión intravenosa de dopamina y la administración intracoronaria de L-NMMA o enalapril^{2,4,59,63}, así como en perros con IC inducida por

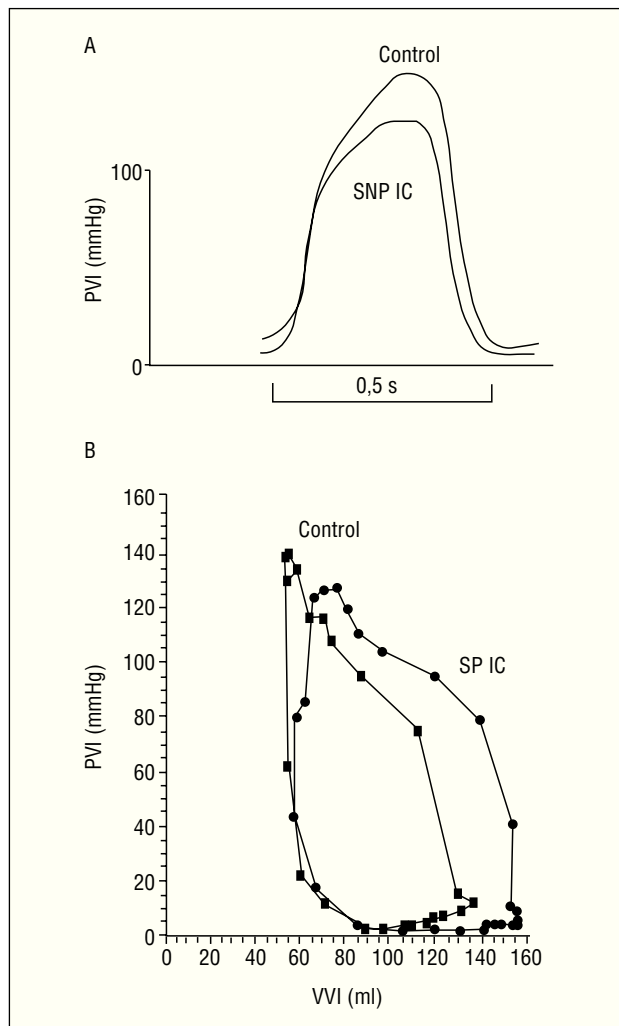


Fig. 2. A: efectos de la administración intracoronaria de nitroprusiato de sodio (SNP IC) sobre la presión del ventrículo izquierdo en el corazón humano normal. B: efectos de la infusión intracoronaria de sustancia P sobre la relación presión-volumen del ventrículo izquierdo en el corazón normal. Modificada de Paulus et al.
VVI: volumen ventrículo izquierdo; PVI: presión ventrículo izquierdo.

estimulación ventricular rápida⁶⁴. Por tanto, en pacientes con MCD, la mejoría de la función diastólica del VI contrarresta la posible reducción de la contractilidad producida por el NO durante la estimulación β -adrenérgica.

En pacientes con IC, el aumento de la NOS2 se correlaciona con una mejor distensibilidad y el mantenimiento del trabajo del latido del VI⁵⁹. En los que presentan un patrón restrictivo de llenado del VI se observa una menor expresión intramiocárdica de NOS2 y NOS3, mientras en que los que presentan un llenado ventricular normal y una evolución más benigna, la expresión de ambas NOS es similar a la observada en el corazón de atleta^{4,62}; ello concuerda con el hecho de que la mejoría producida por los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) o

los bloqueadores beta se acompaña de un aumento en la actividad de la NOS3 intramiocárdica⁶⁵.

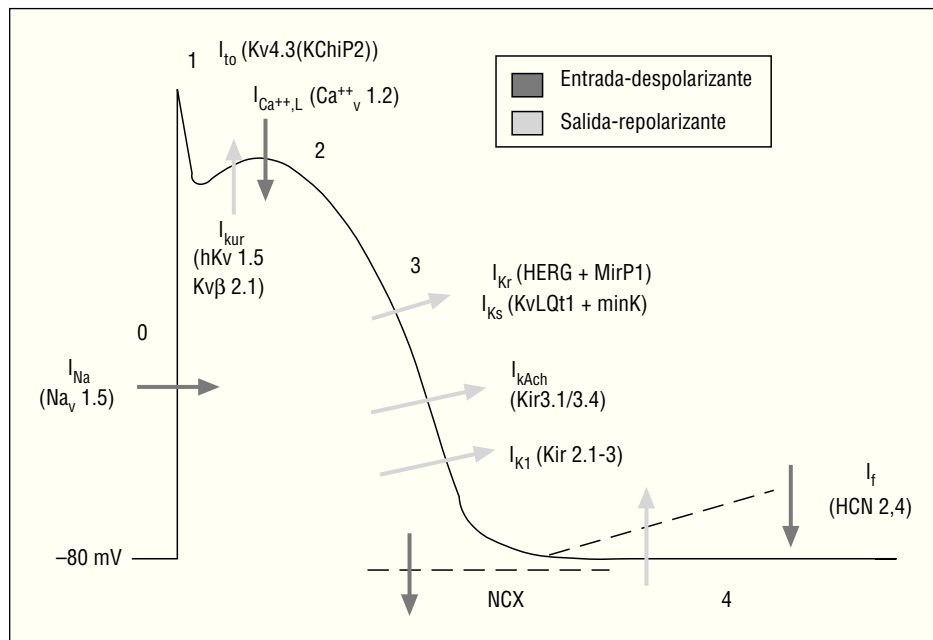
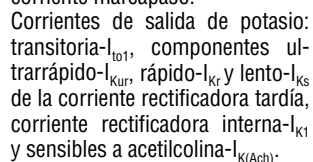
Todos estos resultados sugieren que el NO aumenta la reserva diastólica y participa en el mecanismo de Frank-Starling en respuesta al aumento de precarga a través del incremento de la distensión ventricular.

EFFECTO SOBRE LA FRECUENCIA CARDÍACA

El NO disminuye la frecuencia cardíaca en cardiomiocitos aislados^{1-4,11}. Sin embargo, el efecto directo del NO en las células del nodo senoauricular es variable, ya que activa la corriente marcapaso I_f sensible al GMPc⁶⁶ y/o inhibe el aumento de la $I_{Ca^{++L}}$ producida por el isoproterenol en células del nodo senoauricular⁵⁶. En el nodo auriculoventricular, la NOS3 produce una inhibición dependiente del GMPc de la $I_{Ca^{++L}}$ mediada a través de la degradación del AMPc producido por la PDE 2 tras la estimulación β -adrenérgica⁶⁷.

La NOS3 aumenta el tono vagal cardíaco y participa en el antagonismo producido por la acetilcolina (ACh) sobre la taquicardia causada por la estimulación β -adrenérgica^{1-4,56}. Cuando la ACh estimula los receptores muscarínicos-M2, éstos se translocan a las caveolas junto a la NOS3, que se activa y libera NO; éste activa la vía GMPc-PKG, que inhibe la $I_{Ca^{++L}}$ en las células del nodo senoauricular y la frecuencia cardíaca^{56,67}. De hecho, el efecto cronotrópico negativo de los agonistas muscarínicos y la inhibición de la $I_{Ca^{++L}}$ producida por la ACh en las células marcapaso desaparece en ratones NOS3^{-/-} (tabla 3), pero puede restaurarse tras la transfección del ADNc de la NOS3⁷.

El NO producido por la NOS1 facilita la bradicardia inducida por vía vagal, tanto por aumentar la liberación en el ámbito presináptico de ACh como por inhibir la liberación de noradrenalina (NA)^{24,25}. La NOS1 actúa en la presinapsis (ganglios cardíacos y terminales vagales, donde su expresión alcanza los valores más altos y se colocaliza con la colina acetiltransferasa) y facilita la bradicardia inducida por vía vagal, tanto por aumentar la liberación presináptica de ACh como por inhibir la liberación de NA^{24,25}. El aumento de la liberación presináptica de ACh implica la activación de la vía GCs-GMPc, que inhibe la PDE3 y activa la vía AMPc-PKA; ésta, a su vez, fosforila-activa los canales presinápticos de Ca^{++} tipo N y P que controlan la liberación exocitótica de ACh. En ratones NOS1^{-/-} o tras el bloqueo de la NOS1 disminuye la inhibición vagal de la frecuencia cardíaca (tabla 3) y el aumento de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, mientras que la transfección de la NOS1 en aurículas de cobaya potencia la liberación presináptica de ACh y la bradicardia vagal⁶⁸. La NOS1 también inhibe la liberación de presináptica de NA; ello es consecuencia de la activación producida por el GMPc sobre la PDE2 en los terminales simpáticos, que inhibe la vía AMPc-PKA, la fosforilación de los canales de Ca^{++} tipo N y la libera-

Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6:3A-20A **11A**

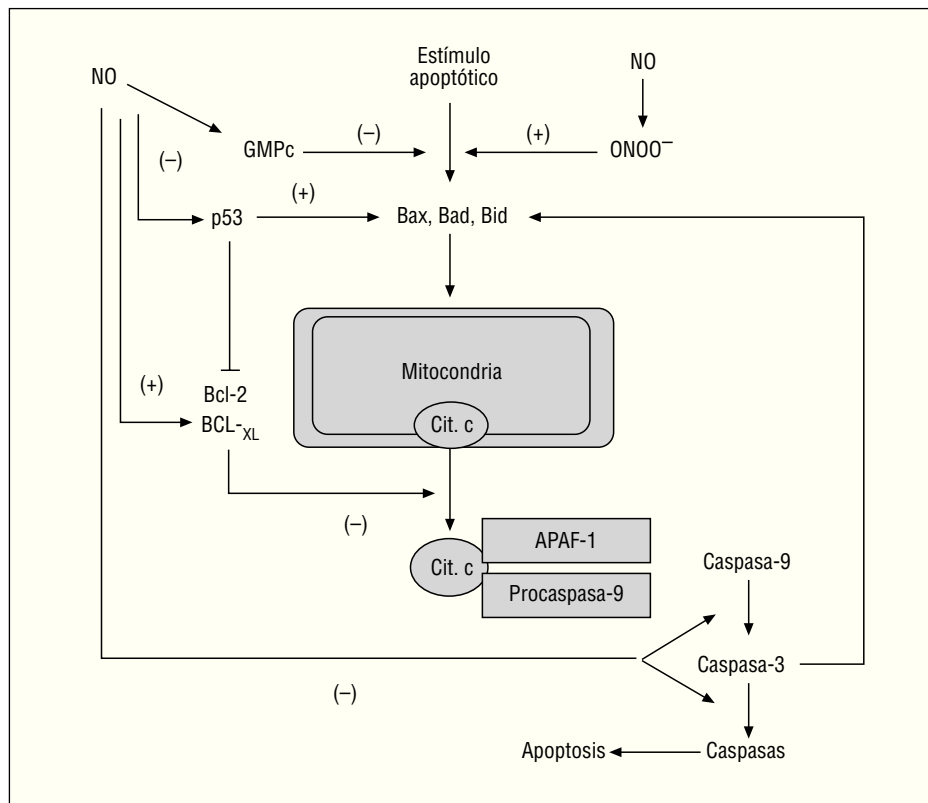


Fig. 4. Mecanismos implicados en las acciones proapoptóticas y antiapoptóticas del óxido nítrico. APAF-1: factor 1 de activación de la apoptosis. Bax, Bad, Bid: genes proapoptóticos; Bcl-2/Bcl-XL: genes antiapoptóticos; Cit c: citocromo c; JNK: cinasa amino terminal c-jun; ONOO⁻: peroxinitrito; P53: gen p53.

el endocardio de la aurícula izquierda, alcanzando valores similares a los de la aorta, que no se modifican; es decir, la FA parece inducir una *disfunción endocárdica* en la aurícula izquierda. Por otra parte, en pacientes con FA crónica: *a)* aumentan el estrés oxidativo auricular, las concentraciones de proteínas S-nitrosiladas y la formación de especies derivadas del NO⁸⁰, lo que podría explicar, en parte, la disfunción contráctil que acompaña a la FA^{81,82}; *b)* disminuyen los valores plasmáticos de nitritos y de GMPc plaquetario, que recuperan sus valores basales tras la cardioversión eléctrica a ritmo sinusal⁸³; *c)* disminuye la vasodilatación mediada por NO endotelial producida en respuesta al ejercicio físico, lo que contribuye a la reducción de la capacidad de ejercicio⁸⁴, y *d)* por último, los ratones NOS3^{-/-} presentan, en ocasiones, episodios de FA no sostenida⁸⁵, lo que sugiere que el NO también podría modular las propiedades eléctricas auriculares y participar en el remodelado eléctrico en la FA.

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA APOPTOSIS CARDÍACA

El NO puede producir efectos proapoptóticos y antiapoptóticos⁸⁶⁻⁸⁹ (fig. 4). El NO producido por la NOS2 parece participar en la apoptosis inducida por citocinas, LPS, angiotensina II, hiperglucemia o isquemia/reperfusión a través de diversos mecanismos: *a)* la generación de peroxinitrito (NO + O₂⁻ → ONOO⁻), un

potente oxidante que aumenta la expresión de la proteína Bax, activa el gen supresor de tumores p53, inhibe los complejos I y II de la cadena respiratoria y facilita la apertura del poro de transición; esta apertura facilita la liberación del citocromo c hacia el citoplasma celular, donde activa el factor activador de apoptosis (APAF-1) y las caspasas 3 y 9; *b)* la activación de la vía GMPc-PKG; *c)* la activación del factor de transcripción AP-1, un efecto mediado a través de las proteincinasas activadas por mitógenos (cinasa de la región N-terminal del factor de transcripción c-jun o JNK y ERK1/2); *d)* la activación del gen supresor de tumores p53, que induce la expresión de proteínas Bax, Bad y Bid que actúan promoviendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria; *e)* la inactivación de la ADN-ligasa, que impide la reparación del daño en el ADN; *f)* la activación de la cinasa de IκB (IKK) que fosforila y degrada al inhibidor (IκBα) del NF-κB, que ahora se transloca al núcleo donde induce la expresión de factores proapoptóticos y *g)* la activación de la cinasa ASK-1 por facilitar su disociación de la tioredoxina que inhibe su actividad.

Por otro lado, a concentraciones fisiológicas, el NO también puede inhibir la apoptosis por: *a)* oxidar el glutatión reducido y estimular las proteínas del choque térmico Hsp32 y 70 que protegen a la célula del estrés oxidativo, inhiben la activación de las caspasas y previenen la liberación de citocromo c; *b)* aumentar los valores de GMPc, lo que disminuye la [Ca⁺⁺]_i, un po-

tente estímulo de la apoptosis, e inhibe la activación de caspasas; c) inducir la S-nitrosilación (Cys163) y la inactivación de las caspasas 3 y 9 y de las cinasas JNK y ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1); d) inducir la denitrosilación de la IKK (en la Cys 169), y e) inhibir la degradación de Bcl-2 y Bcl-XL, que se encuentran en la membrana externa de la mitocondria e inhiben la liberación de citocromo c.

ÓXIDO NÍTRICO EN EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El NO desempeña un importante papel en la fase tardía del preconditionamiento isquémico, protegiendo al miocardio frente al aturdimiento y la necrosis, y en el fenómeno de preconditionamiento remoto^{8,90}. Sin embargo, el papel del NO en la fase temprana del preconditionamiento isquémico es dudoso. La NOS1 participa en la fase tardía del preconditionamiento isquémico producida por la isquemia o el ejercicio, y la NOS2 en la producida por la isquemia, adenosina, agonistas $\delta 1$ opiáceos, endotoxina y ejercicio^{8,91}. Este efecto protector del NO se bloquea con inhibidores de las NOS, se reproduce con dadores de NO (nitratos) y desaparece⁷ en ratones NOS3^{-/-}. Diversos mecanismos participan en el efecto protector de la NO en la fase tardía del preconditionamiento isquémico: a) efectos microvasculares, no sólo vasodilatadores y antiagregantes, sino también inhibidores de la adhesión de neutrófilos al endotelio⁹²; b) la activación de la vía GMPc-PKG, que fosforila-activa canales K_{ATP} del sarcolema y/o mitocondriales (ya que se inhibe por 5-hidroxidecanoato y ODQ, respectivamente)⁹³; como consecuencia, se produce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y se inhibe la captación y la sobrecarga de Ca⁺⁺ en esta organela durante la isquemia; c) la inhibición de la apoptosis cardíaca, y d) la inducción de la NOS2⁹⁴. El NO generado por la NOS3 activa diversas proteincinasas (PKC ϵ , Src) y factores de transcripción (factor nuclear- κ B o NF- κ B), que inducen la expresión de la NOS2; a su vez, el NO producido por la NOS2 puede activar diversas proteínas cardioprotectoras, como la ciclooxigenasa-1 (con la consiguiente producción de prostaglandinas E2 e I2) y la aldosa-reductasa, que confieren resistencia frente al estrés isquémico. Sin embargo, la inducción mantenida de la NOS2 estimula el estrés nitrosativo y la apoptosis⁸⁶.

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA ISQUEMIA CARDÍACA

Durante la fase temprana de la isquemia experimental se observa una respuesta bifásica sobre la actividad de las NOS. Las NOS1 y NOS3 se activan durante los primeros 30-60 min, pero si la isquemia se prolonga y la acidosis aumenta, la actividad de la NOS3 disminuye. Al comienzo de la reperusión, la actividad de la

NOS3 y la producción de NO aumentan, si bien con el tiempo la actividad de la NOS3 y las concentraciones de NO vuelven a sus valores control^{95,96}. Sin embargo, durante la isquemia, la situación es mucho más compleja, ya que también aumentan otros mediadores que modulan la actividad de las NOS (angiotensina II, radicales libres, citocinas) (tabla 2).

Durante la fase aguda del infarto de miocardio, la actividad de la NOS3 no se modifica o aumenta de forma transitoria, normalizando sus valores al cabo de 3 días, mientras que la expresión de la NOS1 aumenta en la primera semana en las zonas infartada y no infartada^{96,97}. La sobreexpresión de la NOS3 cardíaca y la administración de NO o dadores de NO antes o en el momento de la reperusión mejora la función ventricular y el remodelado hipertrófico ventricular en el miocardio remoto⁵⁴ y disminuye la incidencia de IC y la necrosis^{97,98}. Igualmente, en los ensayos clínicos se ha demostrado que la administración antes de la isquemia-reperusión de fármacos que aumentan la expresión de NOS3 (estatinas, amlodipino, carvedilol o IECA) reduce el tamaño del infarto y la disfunción endotelial y ventricular. Por último, la presencia de polimorfismos que inhiben la actividad de la NOS3 (Glu298Asp, G894T, T-786C, 4a/4b) se asocian con un mayor riesgo de infarto de miocardio, restenosis intra-stent, vasospasmo coronario y mortalidad⁹⁹⁻¹⁰¹; el genotipo 786CC se asocia con vasospasmo coronario, y en pacientes con hiperhomocisteinuria incrementa hasta 9 veces el riesgo de eventos coronarios agudos¹⁰¹. Por el contrario, el genotipo no-GG del polimorfismo 4a/4b disminuye la incidencia de síndromes coronarios agudos¹⁰².

Los resultados descritos en ratones NOS3^{-/-} que fueron sometidos a isquemia-reperusión son muy variables y en ocasiones contradictorios, dependiendo del tiempo de isquemia-reperusión^{7,103,104}. Cuando se realiza una isquemia corta (16 min), se observa en estos ratones una mejoría en la recuperación de la contracción-relajación y del metabolismo cardíaco (valores de ATP y fosfocreatina), lo que sugiere que el NO ejercería un efecto deletéreo en estas condiciones, posiblemente porque al reaccionar con anión superóxido podría aumentar los valores de peroxinitrito, lo que lesionaría la célula cardíaca. Sin embargo, en otros estudios se observa un aumento del área de infarto que ha sido atribuido a la reducción del flujo coronario, lo que sugiere el efecto protector de las acciones vasodilatadoras del NO^{103,104}. En ratones NOS3^{-/-} sometidos a 30 min de isquemia aumenta la producción de NO debido a la inducción de la NOS2, que desensibiliza los miofilamentos contráctiles, reduce la respuesta contracturante y el aumento del MVO₂ durante la fase temprana de la reperusión, cuando la disponibilidad energética está disminuida¹⁰⁵. Cuando en estos animales se realiza una ligadura coronaria, el tamaño del infarto de miocardio no se modifica, pero los corazones presentan rarefacción capilar, hipertrofia, disfunción sistólica y diastólica.

ca y una mayor mortalidad¹⁰⁶. Por el contrario, la sobreexpresión de la NOS3 mejora la función y el remodelado hipertrófico ventricular y disminuye la incidencia de IC^{97,98}. Estos hallazgos confirman el papel beneficioso de la NOS3 en el remodelado ventricular postinfarto, posiblemente por aumentar la colateralización coronaria y limitar la hipertrofia cardíaca.

En un modelo crónico de infarto de miocardio (a 6 meses), no se encontraron diferencias entre los ratones NOS3^{-/-} y los normales^{7,107}, lo que concuerda con el hallazgo de que durante la fase crónica de remodelado ventricular postinfarto disminuye la expresión de la NOS3¹⁰⁸ y la inhibición que ésta ejerce sobre el tono simpático¹⁰⁹. Sin embargo, la ausencia de NOS3 disminuye el efecto cardioprotector de los inhibidores de la enzima de conversión y de los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II¹⁰⁷, lo que sugiere que, a pesar de todo, el NO podría modular los efectos del sistema renina-angiotensina sobre el remodelado cardíaco.

La inducción de la NOS2 tiene lugar tras la oclusión coronaria y alcanza su máximo a los 3 días del infarto; posteriormente, su actividad disminuye en la zona infartada, pero persiste elevada al cabo de 1 mes en zonas remotas a ésta (p ej., en el septo interventricular)^{96,109}. El bloqueo de la NOS2 reduce el tamaño del infarto¹¹⁰ y los ratones NOS2^{-/-} sometidos a ligadura coronaria presentan al cabo de 4 meses una mejoría hemodinámica (mayor presión del VI) y una mayor supervivencia atribuible a la reducción de la apoptosis en la zona no infartada¹¹¹. Estos resultados sugieren que la expresión de la NOS2 en la zona no infartada podría contribuir a la progresión de la IC postinfarto.

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

Se ha propuesto que en el NO participa en la fisiopatología de la IC. En la IC hay un desequilibrio NO/re-dox, ya que aumentan las vías enzimáticas que producen radicales libres (p. ej., NADPH oxidasas vasculares, xantino oxidasa (XO) cardíaca, enzimas mitocondriales, hemoglobina oxidasa en los eritrocitos) que oxidan las proteínas que participan en el acoplamiento excitación-contracción e inactivan el NO y alteran la actividad y localización de las enzimas productoras de NO (NOSs y XO)^{112,113}. Ello conduce a un desacoplamiento mecanoenergético, caracterizado porque la reducción de la contracción no se acompaña de una reducción similar en el consumo de energía. Además, hay una marcada activación neurohumoral y un aumento de citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de la NOS2^{109,112} y, en ocasiones, aumentan la actividad de la NOS1 y NOS3³ y se modifica la localización de la NOS1^{108,114}. Sin embargo, la hipótesis de que el NO desempeña un importante papel en la etiopatogenia de la IC no concuerda con el hallazgo de que el

NO ejerce un efecto cardioprotector frente a la isquemia o que en el miocardio insuficiente hay una menor expresión de NOS. De hecho, en modelos experimentales y en pacientes con IC, la actividad de NOS3 puede aumentar, disminuir o no modificarse^{2,7,113}, y la NOS2 aumenta marcadamente en algunos estudios, pero no en todos^{2,7,30,31,108,109,114,115}. Ello sugiere que los cambios en la expresión de NOS2 y NOS3 pueden ser un epifenómeno que acompaña a la IC, pero no su causa.

En el miocardio insuficiente, la disminución del NO podría contribuir a la menor vasodilatación coronaria endotelio-dependiente, a la reducción de la relajación ventricular y al aumento del MVO₂^{64,65}. Desde este punto de vista, la sobreexpresión de la NOS3 debería mejorar estas alteraciones. De hecho, en ratones que sobreexpresan la NOS3 cardíaca humana (30 veces) no se observan alteraciones de la función contráctil o la hipertrofia cardíaca, aunque sí se bloquea la respuesta a la estimulación β A⁵⁴; además, tras realizar una ligadura coronaria presentan una mejoría de la función contráctil y una reducción de la hipertrofia del VI y la mortalidad^{54,97,98}. Por el contrario, ya hemos indicado que los ratones NOS3^{-/-} en los que se realiza una ligadura coronaria presentan al cabo de 4 semanas hipertrofia y dilatación del VI, disminución del acortamiento fraccional y de la FE (aumenta el volumen telediastólico y el diámetro interno del VI), rarefacción vascular y un aumento de la mortalidad^{7,106}. Además, en estos ratones NOS3^{-/-} disminuyen los efectos beneficiosos de enalapril o valsartán¹⁰⁷. Estos resultados sugieren que la NOS3 reduce la disfunción ventricular y el remodelado postinfarto, y participa de alguna forma en la disfunción ventricular producida por la angiotensina II.

También hemos mencionado que, en pacientes con MCD, la disminución del NO no altera la contracción cardíaca, y la infusión intracoronaria de NPS o sustancia P no modifica los parámetros hemodinámicos^{1,4,59,61}. Sin embargo, en un modelo de IC inducido en perros por sobrestimulación se pudo demostrar que la fase de descompensación cardíaca se caracterizaba por una marcada reducción de la producción de NO, de la $dP/dt_{\max}$ y de la distensibilidad ventricular (que aumenta la PTDVI) y un aumento del MVO₂, a la vez que el metabolismo cardíaco pasa de utilizar ácidos grasos a utilizar glucosa como fuente de energía⁶⁴; estos resultados sugieren que el NO participa en el acoplamiento entre el flujo coronario, la actividad contráctil y el metabolismo cardíaco.

En pacientes con MCD aumenta la expresión de la NOS1, que se transloca desde el RS (donde se encuentra acoplada a la XO) al sarcolema, localizándose en la caveolina-3 donde, al igual que sucede con la NOS3, se asocia con una ATP-asa Calcio dependiente regulada por la calmodulina¹¹⁴. Estos cambios de expresión y localización pueden ser beneficiosos en la IC, ya que la NOS1: a) inhibe las respuestas cardíacas a la estimulación de los R β y al inhibir la I_{Ca}⁺⁺, (y quizás la

liberación de Ca^{++} desde el RS) podría ejercer un efecto protector frente a la cardiotoxicidad de las catecolaminas⁴⁷; b) aumenta el tono vagal cardíaco, disminuyendo la frecuencia cardíaca⁶⁹; c) restaura la actividad baroreceptora central, y d) podría compensar la inhibición de la NOS3¹⁰⁸. Sin embargo, es posible también que el desplazamiento de la NOS1 al sarcolema facilite el estrés oxidativo, ya que se perdería el control que ejerce sobre la actividad de la XO en el RS y alteraría el balance óxido/redox del sarcolema¹¹³.

En la IC se observa una reducción de la respuesta inotrópica a la estimulación βA como consecuencia de alteraciones en la densidad receptora (disminuyen los $\text{R}\beta 1$ y $\text{R}\beta 2$ y aumentan los $\text{R}\beta 3$ que median respuestas inotrópicas negativas) o en el acoplamiento del receptor con sus vías de señalización (aumenta la expresión de la cinasa específica del receptor β -adrenérgico o ARK y de proteínas Gi, y disminuyen las Gs). Los $\text{R}\beta 3$ son más resistentes a la desensibilización homóloga que representa el aumento del tono simpático característico de la IC, por lo que su estimulación facilitaría la producción continua de NO en presencia del incremento del tono simpático existente en la IC⁵⁸. Por tanto, el NO sintetizado a través de la vía $\text{R}\beta 3$ -NOS3, de la NOS1 que se ha translocado al sarcolema y de la inducción de la NOS2, modularía la respuesta a las catecolaminas y antagonizaría su toxicidad en el miocardio insuficiente. De hecho, la inhibición de la NOS potencia el aumento contráctil producido por los agonistas β -adrenérgicos en modelos animales² y en pacientes con IC^{50,52,116}. Sin embargo, parece lógico pensar que el NO es tan sólo uno de los factores que regulan la respuesta a los agonistas β -adrenérgicos en el paciente con IC¹¹⁷.

En determinadas circunstancias, el aumento de NO sintetizado tras la inducción de la NOS2 puede ser beneficioso en el miocardio insuficiente, ya que mejora la relajación ventricular^{4,114}, reduce el MVO_2 ¹¹⁸ y la respuesta a la estimulación βA ^{1,2,64} y aumenta la angiogénesis¹¹⁹. En cardiomiocitos de pacientes con trasplante cardíaco, el isoproterenol produce un discreto aumento de la contractilidad y frecuencia cardíacas y la inhibición de la NOS2 normaliza ambas respuestas, así como los transientes de Ca^{++} ¹¹⁵. Sin embargo, la inhibición de la NOS2 no produce ningún efecto en cardiomiocitos normales o en cardiomiocitos de pacientes con IC en los que la respuesta al isoproterenol estaba conservada y en los que la expresión de NOS2 era mínima¹¹⁵. Es decir, en pacientes con IC la expresión de la NOS2 limita la respuesta a los agonistas β -adrenérgicos, un efecto que podría estar mediado por la inhibición de la liberación de Ca^{++} desde el RS a través de una vía independiente del GMPc, pero relacionada con modificaciones del estado redox celular producidas por el peroxinitrito¹²⁰. En ratones en los que se sobreexpresa la NOS2 cardíaca aumenta la generación de peroxinitrito y se observa dilatación, hipertrofia y fibrosis cardíaca; más aún, aunque raramente desarro-

llan IC, sí presentan una alta incidencia de muerte súbita asociada con bradiarritmias¹²¹. Sin embargo, los ratones con sobreexpresión no condicional de la NOS2 presentan un genotipo normal, ya que el NO producido es neutralizado por la mioglobina en el citoplasma; cuando se repiten estos experimentos en ratones carentes de mioglobina, los animales sí presentan hipertrofia, fibrosis intersticial y dilatación ventricular¹²².

Como ya hemos mencionado, en la IC aumentan las vías enzimáticas que producen radicales libres (las NADPH oxidasas cardíacas están muy aumentadas, en parte, debido al aumento de angiotensina II, la XO cardíaca y vascular y la hemoglobina oxidasa eritrocitaria) y se elevan las enzimas productoras de NO (NOSs y XO), lo que produce vasoconstricción y desacoplamiento mecanoenergético¹¹³. De hecho, en modelos animales, la transición hacia la IC descompensada implica un déficit en NOS1 y NOS3 y en la síntesis cardíaca de NO, y un aumento en la actividad de la XO¹¹³. El NO también regula una NADH oxidasa que inhibe la liberación de Ca^{++} por el RS, por lo que el balance entre NO y estrés oxidativo también regula la función cardíaca a través de sus efectos sobre la señalización intracelular del Ca^{++} . La XO, un importante fuente de radical superóxido, aumenta en el miocardio y los vasos de los pacientes con IC¹²³, produciendo disfunción endotelial, depresión de la función cardíaca, desacoplamiento mecánico-energético y apoptosis^{124,125}. La inhibición de la XO con alopurinol mejora la eficiencia mecánica (cociente entre el trabajo ventricular/ O_2 consumido), el remodelado postinfarto de miocardio y la respuesta a las catecolaminas¹²⁶. Lo interesante es que los efectos del alopurinol se suprimen al bloquear la NOS con L-NMMA y los de ésta con alopurinol¹²⁴, lo que indica que hay una interrelación entre ambas vías de señalización¹¹³. Por otro lado, algunos fármacos actualmente utilizados en el tratamiento de la IC, como las estatinas¹²⁷ y los IECA¹²⁸, modifican el balance NO/redox al aumentar los valores de bradicinina y la síntesis de NO, y reducir la producción de radicales libres (superóxido, peroxinitrito) al inhibir la NADPH oxidasa.

Efectos del óxido nítrico sobre la función mitocondrial

Las NOS mitocondriales (NOS1, NOS3 y mtNOS) son las causantes del 50% del NO citosólico en el miocardio de la rata y su actividad aumenta durante la hipoxia^{26,129}. El propio NO, a través de la vía GCs-GMPc, regula la expresión de la mtNOS y la biogénesis mitocondrial, efectos que se asocian con un aumento de la fosforilación oxidativa y del contenido celular de ATP¹³⁰. A concentraciones nM, el NO nitrosila e inhibe la citocromo c oxidasa (complejo IV) y, como consecuencia, la respiración mitocondrial, las enzimas

implicadas en la glucólisis, y el MVO_2 , y el metabolismo energético¹³¹. Además, regula los valores del factor de transcripción inducible por hipoxia y contribuye a la adaptación celular a la hipoxia. A altas concentraciones, el NO directamente y a través de la formación de peroxinitrito inhibe los complejos I y II de la cadena respiratoria y las enzimas del ciclo de Krebs, produciendo una lesión cardíaca directa. En modelos animales, los donadores de NO reducen y los inhibidores de la NOS aumentan el MVO_2 y disminuyen la eficiencia mecánica^{64,124,132}; lo mismo sucede en la IC terminal, caracterizada por la producción de bajas concentraciones cardíacas de $\text{NO}^{2,113}$. Además, la transición hacia la IC descompensada se acompaña de una reducción en la producción de NO y en un cambio en la utilización de sustratos, de ácidos grasos a glucosa, por el corazón⁶⁴. Todo ello sugiere que el NO regula la contracción, el proceso que consume más energía, y también la producción de energía por la mitocondria.

PROBLEMAS METODOLÓGICOS

A lo largo de este capítulo se puede comprobar que los efectos cardíacos del NO son muy variados y, en ocasiones, contradictorios. Lo mismo se puede decir de los resultados obtenidos en animales que carecen de alguna de las isoformas de la NOS (tabla 3). Estas contradicciones, que impiden conocer cuál es el papel real del NO en el control de las propiedades electrofisiológicas y contráctiles del corazón, son debidas a:

- Los efectos del NO varían según la NOS que lo sintetiza, la célula que lo sintetiza y la vía de señalización activada, por lo que hay marcadas diferencias no sólo interespecies, sino entre los distintos tejidos cardíacos (aurícula, ventrículo, tejido de conducción) de una misma especie animal, lo que dificulta la extrapolación de resultados.

- Desconocemos el papel y la importancia de la producción no enzimática de NO en la regulación cardiovascular en condiciones patológicas.

- Los donadores de NO no siempre reproducen los efectos del NO endógeno liberado en determinados dominios celulares. Además, también hay importantes diferencias entre ellos en cuanto a su lipofilia, cinética de liberación y magnitud de la liberación de NO y selectividad tisular. Igualmente, hay importantes diferencias en la selectividad y en las propiedades de los inhibidores de las NOS, y se olvida que algunas de sus acciones pueden ser independientes del bloqueo de las NOS. Todo ello dificulta la comparación de los resultados obtenidos con los distintos donadores de NO e inhibidores de NOS.

- En los modelos *in vitro* se elimina el importante papel que los elementos formes (plaquetas, leucocitos, macrófagos) de la sangre desempeñan en los efectos vasculares del NO.

- En modelos transgénicos en los que se suprimen o se sobreexpresan las NOS se ponen en marcha mecanismos compensatorios (expresión de otras isoformas de la NOS, liberación de péptidos natriuréticos o prostaglandinas) que confunden/dificultan la interpretación de los resultados.

- El papel del NO varía marcadamente según las condiciones experimentales: dosis, tono autonómico cardíaco, temperatura (que determina la actividad enzimática de las NOS), edad de los animales (determina la presencia e intensidad de la hipertrofia cardíaca), estado redox, tensión de O_2 y enfermedad asociada.

CONCLUSIONES

El NO sintetizado por las NOS constitutivas (NOS1 y NOS3) desempeña un importante papel en el acoplamiento electromecánico producido en respuesta a la distensión, los cambios de frecuencia o la estimulación de los receptores β_1/β_2 -adrenérgicos, y modula el control vegetativo de la función cardíaca, potenciando el tono vagal e inhibiendo el tono simpático. Además, el NO acelera la relajación cardíaca participando en el mecanismo de Frank-Starling y regula la respiración mitocondrial y la producción de energía cardíaca. En el miocardio isquémico, el NO ejerce un efecto cardioprotector por sus acciones vasodilatadores y antitrombóticos, y desempeña un papel determinante en la fase tardía del precoz disociamiento isquémico. En el miocardio insuficiente, la vía NOS3-receptores β_3 -adrenérgicos y la inducción de la NOS2 contribuye a atenuar los efectos cardiotóxicos de las catecolaminas ejercidos a través de la estimulación de los $\text{R}\beta_1$ y β_2 -adrenérgicos. Esta multiplicidad de efectos que el NO ejerce sobre función cardíaca es posible gracias a que cada estímulo específico activa una determinada NOS que se encuentra compartimentalizada en puntos específicos de los cardiomiocitos y se acopla a una determinada vía de señalización. Sin embargo, desconocemos cómo cada isoforma modula la función cardíaca, las vías de señalización de cada NOS en los distintos componentes celulares del corazón y el papel que la inhibición/sobreexpresión desempeña en condiciones fisiopatológicas. Toda esta información es necesaria antes de poder trasladar las múltiples acciones del NO en una alternativa terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*. 2003; 93:388-98.
2. Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:719-29.
3. Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2005;108:225-56.

4. Paulus WJ, Bronzwaer JG. Nitric oxide's role in the heart: control of beating or breathing? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H8-13.
5. Andreka P, Tran T, Webster KA, Bishopric NH. Nitric oxide and promotion of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2004;263:35-53.
6. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 2002;416:337-9.
7. Massion PB, Balligand JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol*. 2003;546:63-75.
8. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1897-918.
9. Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem*. 1999;274:14692-8.
10. Brahmajothi MV, Campbell DL. Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ Res*. 1999;85:575-87.
11. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*. 1996;79:363-80.
12. Fulton D, Papapetropoulos A, Zhang X, Catravas JD, Hintze TH, Sessa WC. Quantification of eNOS mRNA in the canine cardiac vasculature by competitive PCR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H658-65.
13. Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes: implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem*. 1998;273:30249-50.
14. Dedkova EN, Blatter LA. Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry and enhances endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*. 2002;539:77-91.
15. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399:597-601.
16. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 2001;293:2449-52.
17. Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, et al. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:11375-80.
18. Woodman SE, Park DS, Cohen AW, Cheung MW, Chandra M, Shirani J, et al. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem*. 2002;277:38988-97.
19. Park DS, Woodman SE, Schubert W, Cohen AW, Frank PG, Chandra M, et al. Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am J Pathol*. 2002;160:2207-17.
20. Sunada Y, Ohi H, Hase A, Ohi H, Hosono T, Arata S, et al. Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Human Mol Genet*. 2001;10:173-8.
21. Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation*. 2001;103:113-8.
22. Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, et al. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem*. 2002;277:42344-51.
23. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. 2001;88:E68-75.
24. Paton JF, Kasparov S, Paterson DJ. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci*. 2002;25:626-31.
25. Sears CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359:1021-44.
26. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2002;277:38079-86.
27. Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:657-62.
28. Worrall NK, Misko TP, Sullivan PM, Hui JJ, Rodi CP, Ferguson TB. Corticosteroids inhibit expression of inducible nitric oxide synthase during acute cardiac allograft rejection. *Transplantation*. 1996;61:324-8.
29. Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM. Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1996;347:1151-5.
30. Thoenes M, Forstermann U, Tracey WR, Bleese NM, Nussler AK, Scholz H, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:165-9.
31. De Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Martin JF. Myocardial calcium-independent nitric oxide synthase activity is present in dilated cardiomyopathy, myocarditis, and post-partum cardiomyopathy but not in ischaemic or valvular heart disease. *Br Heart J*. 1995;74:426-30.
32. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003;9:1498-505.
33. Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2002;540:457-67.
34. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res*. 1999;84:1020-31.
35. Campbell DL, Stamler JS, Strauss HC. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol*. 1996;107:277-93.
36. Miyamoto A, Laufs U, Pardo C, Liao JK. Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. *J Biol Chem*. 1997;272:19601-8.
37. Kaye DM, Wiviott SD, Kelly RA. Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a Ca^{2+} -independent manner in cardiac myocytes: role of troponin I phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;256:398-403.
38. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation, the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001;106:675-83.
39. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 1998;279:234-7.
40. Zahradnikova A, Minarovic I, Venema RC, Meszaros LG. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium*. 1997;22:447-54.
41. Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996;78:91-101.
42. Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation*. 1996;93:1223-9.
43. Cotton JM, Kearney MT, McCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on basal function and the force-frequency relationship

- in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation*. 2001;104:2318-23.
44. Kirstein M, Rivet-Bastide M, Hatem S, Benardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest*. 1995;95:794-802.
45. Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG. 8-Bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. *Circ Res*. 1994;74:970-8.
46. Brunner F, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B. Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2001;104:3097-102.
47. Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and β -adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation*. 2002;105:3011-6.
48. Ren J, Zhang X, Scott GI, Esberg LB, Ren BH, Culver B, Chen AF. Adenovirus gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase enhances contractile function in ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43:171-7.
49. Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, et al. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res*. 2003;92:1322-9.
50. Hare JM, Loh E, Creager MA, Colucci WS. Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to β -adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. *Circulation*. 1995;92:2198-203.
51. Gyurko R, Kuhlencordt P, Fishman MC, Huang PL. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H971-81.
52. Varghese P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM. β_3 -Adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest*. 2000;106:697-703.
53. Champion HC, Georgakopoulos D, Takimoto E, Isoda T, Wang Y, Kass DA. Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3. *Circ Res*. 2004;94:657-63.
54. Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;94:1256-62.
55. Mery P-F, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca^{2+} current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:1197-201.
56. Han X, Shimoni Y, Giles WR. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J Gen Physiol*. 1995;106:45-65.
57. Gauthier C, Langin D, Balligand JL. β_3 -Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21:426-31.
58. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*. 2001;103:1649-55.
59. Paulus WJ. The role of nitric oxide in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2001;6:105-18.
60. Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, et al. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res*. 1997;81:372-9.
61. Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T. β -Adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1997;273:C1371-7.
62. Bronzwaer JG, Zeitz C, Visser CA, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and the hemodynamic phenotypes of human dilated cardiomyopathy and of athlete's heart. *Cardiovasc Res*. 2002;55:270-8.
63. Wittstein IS, Kass DA, Pak PH, Maughan WL, Fetics B, Hare JM. Cardiac nitric oxide production due to angiotensin-converting enzyme inhibition decreases beta-adrenergic myocardial contractility in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:429-35.
64. Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res*. 1998;83:969-79.
65. Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JG, Shah AM, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99:3009-16.
66. Musialek P, Lei M, Brown HF, Paterson DJ, Casadei B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I_h . *Circ Res*. 1997;81:60-8.
67. Han X, Kobzik L, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca^{2+} current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res*. 1996;78:998-1008.
68. Choate JK, Danson EJ, Morris JF, Paterson DJ. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H2310-7.
69. Takimoto Y, Aoyama T, Tanaka K, Keyamura R, Yui Y, Sasayama S. Augmented expression of neuronal nitric oxide synthase in the atria parasympathetically decreases heart rate during acute myocardial infarction in rats. *Circulation*. 2002;105:490-6.
70. Mohan RM, Heaton DA, Danson EJ, Krishnan SP, Cai S, Channon KM, et al. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer promotes cardiac vagal gain of function. *Circ Res*. 2002;91:1089-91.
71. Fei L, Baron AD, Henry DP, Zipes DP. Intrapericardial delivery of L-arginine reduces the increased severity of ventricular arrhythmias during sympathetic stimulation in dogs with acute coronary occlusion: nitric oxide modulates sympathetic effects on ventricular electrophysiological properties. *Circulation*. 1997;96:4044-9.
72. Kubota I, Han X, Opel DJ, Zhao YY, Baliga R, Huang P, et al. Increased susceptibility to development of triggered activity in myocytes from mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1239-48.
73. Ahmmed GU, Xu Y, Hong Dong P, Zhang Z, Eiserich J, Chiamvimonvat N. Nitric oxide modulates cardiac Na^+ channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res*. 2001;89:1005-13.
74. Han J, Kim N, Joo H, Kim E, Earm YE. ATP-sensitive K^+ channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1545-54.
75. Abi-Gerges N, Szabo G, Otero AS, Fischmeister R, Mery PF. NO donors potentiate the beta-adrenergic stimulation of $I_{\text{Ca,L}}$ and the muscarinic activation of $I_{\text{K,ACh}}$ in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2002;540:411-24.
76. Taglialatela M, Pannaccione A, Iossa S, Castaldo P, Annunziato L. Modulation of the K^+ channels encoded by the human ether-a-gogo-related gene-1 (hERG1) by nitric oxide. *Mol Pharmacol*. 1999;56:1298-308.
77. Bai CX, Takahashi K, Masumiya H, Sawanobori T, Furukawa T. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K^+ current and the L-type Ca^{2+} current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*. 2004;142:567-75.
78. Núñez L, Gómez R, Vaquero M, García-Méndez A, Caballero R, López-Farré A, et al. Effects of nitric oxide on a human atrial potassium channel (hKv1.5). *Eur Heart J* 2005;26 Suppl:453.
79. Cai H, Li Z, Goette A, Mera F, Honeycutt C, Feterik K, et al. Downregulation of endocardial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in atrial fibrillation. *Circulation*. 2002;106:2854-8.
80. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271:C1424-37.

81. Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S, et al. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res*. 2001;89: E32-8.
82. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation*. 2001; 104:174-80.
83. Nikitovic D, Zacharis EA, Manios EG, Malliaraki NE, Kanou-pakis EM, Sfiridaki KI, et al. Plasma levels of nitrites/nitrates in patients with chronic atrial fibrillation are increased after electrical restoration of sinus rhythm. *J Interv Card Electrophysiol*. 2002;7:171-6.
84. Takahashi N, Ishibashi Y, Shimada T, Sakane T, Ohata S, Sugamori T, et al. Impaired exercise-induced vasodilatation in chronic atrial fibrillation-role of endothelium-derived nitric oxide. *Circ J*. 2002;66:583-8.
85. Rakhit A, Maguire CT, Wakimoto H, Gehrmann J, Li GK, Kelly RA, et al. In vivo electrophysiologic studies in endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12:1295-301.
86. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282:1075-9.
87. Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res*. 1999;85:829-40.
88. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:214-20.
89. Jekabsone A, Ivanoviene L, Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:803-9.
90. Baker CS, Kumar S, Rimoldi OE. Effects of brief ischemia and reperfusion on the myocardium and the role of nitric oxide. *Heart Fail Rev*. 2003;8:127-41.
91. Kolar F, Ostadal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res*. 2004;53:S3-13.
92. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ, Zhao Z, Fowler WC III, McGee S, et al. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol*. 1992;263:H1650-8.
93. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*. 2000;101:439-45.
94. Wang Y, Guo Y, Zhang SX, Wu WJ, Wang J, Bao W, et al. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:5-15.
95. Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, Banerjee S, Takano H, Han H, et al. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol*. 2000;279: H2360-71.
96. Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, et al. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol*. 2001;79:307-9.
97. Jones SP, Greer JJ, Van Haperen R, Duncker DJ, De Crom R, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc Natl Acad Sci SA*. 2003;100:4891-6.
98. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H276-82.
99. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. 2004;109:1359-65.
100. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the pre-disposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2004;147: 516-21.
101. Petrovic D, Peterlin B. Genetic markers of restenosis after coronary angioplasty and after stent implantation. *Med Sci Monit*. 2005;11:127-35.
102. Park KW, You KH, Oh S, Chae IH, Kim HS, Oh BH, et al. Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans. *Heart*. 2004;90:282-5.
103. Sharp BR, Jones SP, Rimmer DM, Lefer DJ. Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS- deficient mice. *Am J Physiol*. 2002;282:H2422-6.
104. Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32:35-42.
105. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000; 101:2742-8.
106. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasseri B, Aretz HT, et al. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104:1286-91.
107. Liu YH, Xu J, Yang JP, Yang F, Shesely E, Carretero OA. Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure. *Hypertension*. 2002;39:375-81.
108. Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviero P, Boczkowski J, et al. Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J*. 2003;17:1934-6.
109. Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freeman GL. β -Adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling. *Circulation*. 2000;101:2103-9.
110. Saito T, Hu F, Tayara L, Fahas L, Shennib H, Giaid A. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H339-45.
111. Sam F, Sawyer DB, Xie Z, Chang DL, Ngoy S, Brenner DA, et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001;89:351-6.
112. Drexler H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a doubled-edged sword? *Circulation*. 1999;99:2972-5.
113. Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*. 2005;115:509-17.
114. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*. 2004;363:1365-7.
115. Ziolo MT, Maier LS, Piacentino V 3rd, Bossuyt J, Houser SR, Bers DM. Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted β -adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca^{2+} transients. *Circulation*. 2004;109:1886-91.
116. Shinke T, Takaoka H, Takeuchi M, Hata K, Kawai H, Okubo H, et al. Nitric oxide spares myocardial oxygen consumption through attenuation of contractile response to β -adrenergic stimulation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2000;101:1925-30.
117. Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Simmons WW, Okada I, Kobzik L, Lowenstein CJ, et al. Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to β -adrenergic agonists. *Circ Res*. 1995;77:494-502.
118. Chen Y, Traverse JH, Du R, Hou M, Bache RJ. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. *Circulation*. 2002;106:273-9.

119. Jones MK, Tsugawa K, Tarnawski AS, Baatar D. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:520-8.
120. Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca^{2+} sparks: influence of β -adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H2295-303.
121. Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest*. 2002;109:735-43.
122. Godecke A, Molojavi A, Heger J, Fogel U, Ding Z, Jacoby C, et al. Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress. *J Biol Chem*. 2003;278:21761-6.
123. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure-role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002;106:3073-8.
124. Saavedra WF, Paolocci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, et al. 2002. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res*. 2002;90:297-304.
125. Cappola T, Kass DA, Nelson G, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi Z, et al. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;104:2407-11.
126. Doehner W, Schoene N, Rauchhaus M, Leyva-Leon F, Pavitt DV, Reaveley DA, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies. *Circulation*. 2002;105:2619-24.
127. Haendeler J, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation*. 2004;110:856-61.
128. Wittstein IS, Kass DA, Pak PH, Maughan WL, Fetters B, Hare JM. Cardiac nitric oxide production due to angiotensin-converting enzyme inhibition decreases beta-adrenergic myocardial contractility in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:429-35.
129. Zaobornyj T, Valdez LB, La Padula P, Costa LE, Boveris A. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol*. 2005;98:2370-5.
130. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:16507-12.
131. Trochu JN, Bouhour JB, Kaley G, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease. *Circ Res* 2000;87: 1108-1117. *Circulation*. 2004;110:856-61.
132. Suto N, Mikuniya A, Okubo T, Hanada H, Shinozaki N, Okumura K. Nitric oxide modulates cardiac contractility and oxygen consumption without changing contractile efficiency. *Am J Physiol*. 1998;275:H41-9.