



ARTÍCULO ESPECIAL

Óxido nítrico y factores relacionados a oxidación e inflamación como posibles biomarcadores de insuficiencia cardíaca



Roberto Bonafede^a y Walter Manucha^{b,c,*}

^a Unidad de Insuficiencia Cardíaca, Hospital Central, Mendoza, Argentina

^b Institute of Medical and Experimental Biology of Cuyo, National Scientific and Technical Research Council (IMBECU-CONICET), Argentina

^c Pharmacology Area, Pathology Department, Medical Sciences College, National University of Cuyo, Argentina

Recibido el 27 de octubre de 2017; aceptado el 13 de diciembre de 2017

Disponible en Internet el 22 de febrero de 2018

PALABRAS CLAVE

Biomarcadores;
Óxido nítrico;
Insuficiencia
cardíaca;
Enfermedad
cardiovascular

KEYWORDS

Biomarkers;
Nitric oxide;
Heart failure;
Cardiovascular
disease

Resumen Como enfermedad cardiovascular prevalente, la insuficiencia cardíaca es una de las principales causas de morbilidad prematura. Por ello, existe un especial interés sobre el estudio de marcadores eficientes asociados al riesgo y/o predicción de eventos cardiovasculares. En consecuencia se proponen a múltiples candidatos, pero sobresalen especialmente aquellos implicados en procesos oxidativos e inflamatorios propios de la enfermedad cardiovascular como el anión superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito. En este sentido, existe una falta de conocimiento sobre las potenciales utilidades de estos sistemas como biomarcadores. La presente revisión procura contribuir a la mayor comprensión de estos sistemas para una mejor caracterización de pacientes. Por otra parte, un profundo conocimiento de estos complejos sistemas también permitiría proponer nuevas líneas de investigación para el desarrollo de inéditas herramientas terapéuticas como una auspiciosa frontera para el abordaje de esta patología. © 2018 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Nitric oxide and related factors linked to oxidation and inflammation as possible biomarkers of heart failure

Abstract As a prevalent cardiovascular disease, heart failure is one of the leading causes of morbidity and premature mortality. Therefore, there is a special interest in the study of efficient markers associated with risk and / or prediction of cardiovascular events. Multiple

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: wmanucha@yahoo.com.ar (W. Manucha).

candidates are proposed, especially those involved in oxidative and inflammatory processes typical of cardiovascular disease, such as superoxide anion, nitric oxide, and peroxynitrite. There is a lack of knowledge on the potential usefulness of these systems as biomarkers. This review aims to contribute to a better understanding of these systems, as well as an improved patient profile. Furthermore, a deep knowledge of these complex systems would also allow proposing new lines of research for the development of new therapeutic tools as a promising start for new approaches to this disease.

© 2018 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

En relación a la enfermedad cardiovascular (ECV), existe un especial interés sobre el estudio y desarrollo de marcadores eficientes asociados al riesgo y/o predicción de eventos, que a su vez posibiliten una oportuna intervención, lo que finalmente valide su potencial de predicción de riesgo cardiovascular. Este contexto conduce la búsqueda de nuevos biomarcadores en donde se discuten y proponen a múltiples candidatos; no obstante sobresalen especialmente los implicados en procesos oxidativos e inflamatorios inherentes a la ECV. De hecho, las especies reactivas de oxígeno (ERO), en especial el anión superóxido ($O^{\cdot -}$) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN), tales como el óxido nítrico (NO) y peroxinitrito, manifiestan funciones protagónicas (fig. 1). En este sentido, y con especial énfasis sobre el conocimiento de las vías de señalización implicadas en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (IC), existe una falta de conocimiento sobre las potenciales utilidades de estos sistemas como biomarcadores. La mayor comprensión posibilitaría una mejor caracterización y también abriría nuevas líneas de investigación para el desarrollo de inéditas herramientas terapéuticas, lo que podría significar una auspiciosa frontera para el abordaje de esta patología.

Específicamente se han investigado distintos sistemas neurohumorales para identificar biomarcadores con buena capacidad predictora, sin embargo, pocos cumplen con todos los criterios requeridos para que aporten utilidad a la clínica. Surge entonces la necesidad de continuar en la búsqueda de más y mejores sustancias que constituyan una contribución superadora.

En los últimos años, ha sido reconocida a la ECV como un «continuo» que involucra una multiplicidad de entidades tales como la enfermedad primaria del músculo cardíaco (miocardiopatía), hipertensión arterial (HTA), hipertrofia ventricular izquierda (HVI), enfermedad coronaria aterosclerótica, arritmias cardíacas, diabetes mellitus; y donde la IC resulta la vía final común de todas ellas con alteración de las vías de señalización que involucran al NO, ERO/ERN, NADPH oxidasa (Nox) y superóxido dismutasa (SOD).

La IC es frecuentemente abordada desde la perspectiva de los principales mecanismos que inducen daño y remodelado ventricular como resultado de la sobreestimulación

neurohumoral a partir de los sistemas renina-angiotensina-aldosterona (RAS) y adrenérgico. Estas alteraciones resultan clásicas y marcan la evolución de la enfermedad. De particular interés para la presente revisión, el aumento de la resistencia vascular periférica y el remodelado cardíaco constituyen las principales alteraciones y se encuentran condicionadas a las vías de señalización que previamente fueran mencionadas. Por lo tanto, resulta novedosa la propuesta de evaluar la evolución de la IC pero desde una perspectiva inédita para la práctica clínica como lo es el formado por las vías de señalización que implican al ON, O-Nox y SOD. En acuerdo con esta sugerencia, ha sido recientemente referido que el deterioro en las vías de señalización que involucran al NO y factores relacionados, estarían asociados a pronóstico y/o mortalidad durante la IC.

Por otro lado, el uso de biomarcadores clásicos en IC y las drogas para su tratamiento, resultan costosos y de difícil acceso para el paciente principalmente en el ámbito de la salud pública. Consecuentemente, la IC resulta una enfermedad de importancia epidemiológica, sanitaria y económica. Esto justifica el apoyo para la realización de grandes esfuerzos de investigación a los efectos de su mejor comprensión, tratamiento y seguimiento. Por lo que el desarrollo de nuevas metodologías de estudio sobre evolución/pronóstico, más accesibles y de menor costo, permitirían alterar positivamente la evolución natural de este síndrome. La implementación de biomarcadores de esta naturaleza –utilizados para mejorar la expectativa y calidad de vida– podrían además colaborar con estudios sobre evaluación de drogas y dispositivos electrofisiológicos durante la IC.

Biomarcadores en insuficiencia cardíaca

En términos generales los biomarcadores proporcionan información pronóstica útil en pacientes con IC y actualmente revisten un interés considerable en la determinación de su capacidad para guiar la terapia en casos de IC aguda y crónica. Bajo estos preceptos, Richards y Braunwald enumeraron marcadores neurohumorales, inflamatorios, de estrés oxidativo, de remodelado de matriz intersticial, de lesión miocitaria y otros considerados más novedosos, que reflejan distintos aspectos fisiopatológicos de la IC^{1,2}.

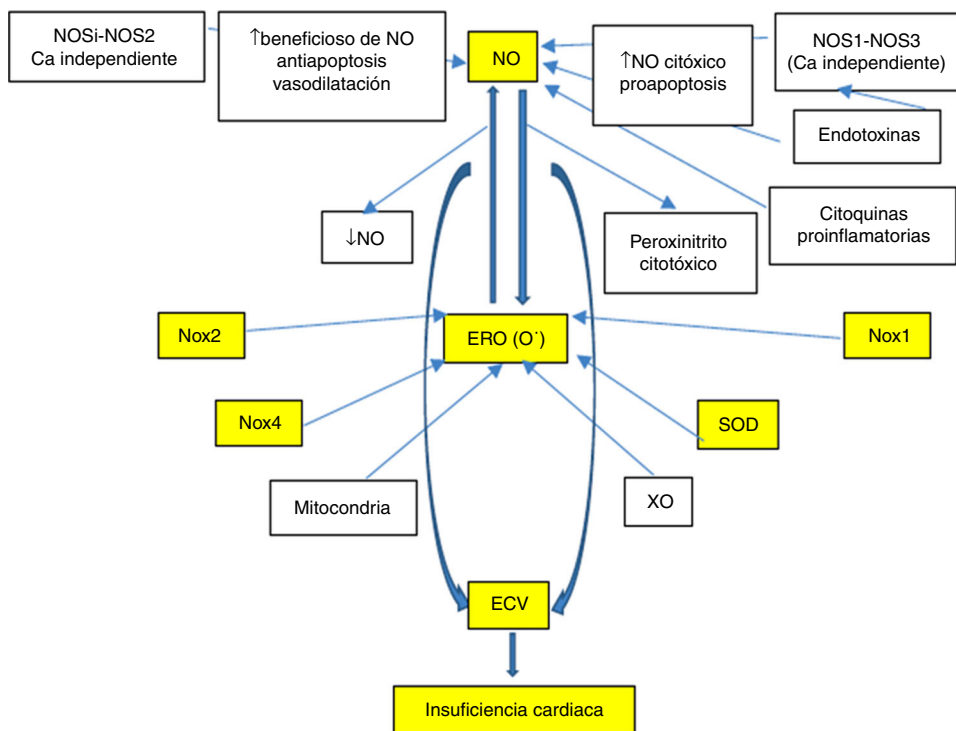


Figura 1 Principales mecanismos relacionados con ERO y ERN implicados en la enfermedad cardiovascular.

Actualmente son de preferencia por su valor diagnóstico/predictivo en IC, los marcadores neurohumorales conocidos como péptidos natriuréticos cardíacos de tipo B (BNP, NT-proBNP y proBNP) que se producen en el ventrículo izquierdo (VI) y en el ventrículo derecho (VD), y que específicamente informan sobre presión de llenado del VI y tensión parietal. Sin embargo, también aumentan cuando el paciente tiene falla derecha sin falla de VI como por ejemplo se observa en las enfermedades respiratorias con cor pulmonar crónico y en la hipertensión arterial pulmonar del grupo 1 (Niza). Estos marcadores permiten excluir IC reduciendo imprecisiones y costos, siendo su determinación seriada una herramienta útil para identificar el momento adecuado para el alta y la evolución postalta.

Por lo expuesto, los biomarcadores en general resultan útiles pero también muestran limitaciones al momento de su utilización. Su utilidad clínica está relacionada con que la determinación facilite el manejo clínico y mejore el pronóstico de una o más de situaciones como para mejorar la certeza diagnóstica, asociación al riesgo de aparición o agravamiento de IC –aquí lo ideal es que conlleve una respuesta con un tratamiento específico–, también la monitorización a través de determinaciones seriadas de marcadores debería mejorar los resultados obtenidos en el seguimiento del paciente, es decir menos descompensaciones agudas, reducción de la mortalidad y/o mejora de la calidad de vida.

Por otro lado, el uso de biomarcadores en IC plantea el rol del laboratorio y el valor de una simple muestra de sangre en el diagnóstico, pronóstico, monitoreo de la evolución y para guiar la terapia. De este modo, el mayor conocimiento obtenido sobre el protagonismo de los sistemas neurohormonales en la evolución de la IC, ha permitido lograr importantes progresos terapéuticos desde mediados de los ochenta. Esto

se ha basado en el estudio de las concentraciones circulantes de marcadores de tensión miocitaria, BNP-proBNP y NT-pro BNP, que resultaron ser además, los más cercanos a los clásicos postulados del biomarcador ideal. Sin embargo, además de los marcadores mencionados, en los últimos años se investigan con especial atención a moduladores del estrés oxidativo y donde las vías de señalización del NO, Nox-ERO y la SOD manifiestan una importante participación en el desarrollo de la ECV (fig. 1). Así, un profundo conocimiento de ellos permitiría comprender más en detalle los mecanismos, cambios neurohumorales y daños biomoleculares que a la fecha no resultan completamente establecidos y que ocurren durante la IC.

Óxido nítrico como biomarcador en insuficiencia cardíaca

Múltiples estudios han demostrado la participación del NO en la fisiopatología de la IC y en donde existe un marcado desequilibrio NO/redox a expensas del incremento de las vías enzimáticas que producen radicales libres como son las Nox vasculares, XO cardíaca, enzimas mitocondriales, hemoglobina oxidasa en eritrocitos, entre las más destacadas. En términos generales esto produce oxidación de las proteínas que participan del acoplamiento excitación-contracción, y también promueven una menor biodisponibilidad del NO a expensas de alterar la actividad y/o localización de las enzimas productoras (NOS y XO)^{3,4}. Lo cual conlleva al desacople mecanoenergético característico debido a que la reducción de la contracción no se acompaña de una reducción proporcional en el consumo de energía. También existe una marcada activación neurohumoral con aumento

de citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de NOS^{2,5} y, en ocasiones, aumentan las actividades de NOS1 y NOS3 modificándose la localización de la NOS^{16,7}. 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 mismo elemento ejerce un efecto cardioprotector frente a la isquemia o que en el miocardio insuficiente hay una menor expresión de NOS y/o menor biodisponibilidad en pacientes con IC. De hecho, en modelos experimentales y en pacientes con IC, la actividad de NOS3 puede aumentar, disminuir o mantenerse invariable^{4,8,9} y en donde la NOS2 aumenta marcadamente para algunos estudios, pero no en todos los casos^{5-7,10-14}. Ello sugeriría –al menos en parte– que los cambios en la expresión de NOS2 y NOS3 podrían responder a un epifenómeno que acompaña a la IC, pero sin ser determinantes de su causa (fig. 1).

En el miocardio insuficiente, la disminución del NO contribuiría a una menor vasodilatación coronaria endotelio-dependiente, a la reducción de la relajación ventricular y al aumento del consumo de oxígeno máximo (MVO₂)^{15,16}. Por lo tanto, la sobreexpresión de NOS3 debería mejorar estas alteraciones como ha sido demostrado en algunos estudios experimentales, además, tras realizar una ligadura coronaria existe una mejoría de la función contráctil y una reducción de la hipertrofia del VI y la mortalidad¹⁷⁻¹⁹; mientras que ratones noquedados para NOS3 en los que también se realizó ligadura coronaria, presentaron hipertrofia y dilatación del VI, disminución del acortamiento fraccional, de la fracción de eyección, con aumento del volumen telediastólico, del diámetro interno del VI, rarefacción vascular y un aumento de la mortalidad^{8,20}. También, en estos ratones disminuyen los efectos beneficiosos de enalapril o valsartán²¹. Estos resultados sugieren que la NOS3 reduce la disfunción ventricular y el remodelado postinfarto, y además participaría de alguna forma en la disfunción ventricular producida por la angiotensina II.

Por otro lado ha sido comunicado en pacientes con miocardiopatía dilatada (MCD) que la disminución del NO no altera la contracción cardíaca, y donde la infusión intracoronaria de nitroprusiato de sodio o sustancia P, no modifica los parámetros hemodinámicos^{10,22-24}. Sin embargo, en un modelo animal de IC inducido 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 máx y de la distensibilidad ventricular (que aumenta la presión telediastólica del VI con aumento del MVO₂), a la vez que el metabolismo cardíaco pasa de utilizar ácidos grasos a utilizar glucosa como fuente de energía¹⁵; estos resultados sugieren que el NO participaría del acoplamiento entre el flujo coronario, la actividad contráctil y el metabolismo cardíaco.

En pacientes con MCD aumenta la expresión de NOS1, que se transloca desde el retículo sarcoplásmico (donde se encuentra acoplada a XO) al sarcolemma, donde al igual que sucede con la NOS3, se asocia con una ATP-asa calcio dependiente regulada por calmodulina⁷. Estos cambios de expresión y localización pueden ser beneficiosos durante la IC, ya que NOS1: a) inhibe las respuestas cardíacas a la estimulación de los receptores β y al inhibir la corriente de Ca⁺⁺, y quizás la liberación de Ca⁺⁺ desde el retículo sarcoplásmico, podría ejercer un efecto protector frente a la cardiotoxicidad de las catecolaminas²⁵. b) Aumenta el

tono vagal cardíaco, disminuyendo la frecuencia cardíaca²⁶. c) Restaura la actividad baroceptora central; y d) podría compensar la inhibición de NOS3⁷. Sin embargo, es posible también que el desplazamiento de NOS1 al sarcolemma facilite el estrés oxidativo, ya que se perdería el control que ejerce sobre la actividad de XO en el retículo sarcoplásmico y además esto alteraría el balance óxido/redox del sarcolemma⁹.

De interés, durante la IC se observa una reducción de la respuesta inotrópica a la estimulación β como consecuencia de alteraciones en la densidad de receptores (disminuyen los receptores β 1 y β 2, y aumentan los β 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 β 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 IC²⁷. Por tanto, el NO sintetizado a través de la vías β 3-NOS3, NOS1 translocado al sarcolemma, y de la inducción de la NOS2, modularían la respuesta a las catecolaminas y antagonizarían su toxicidad en el miocardio insuficiente. De hecho, la inhibición de las NOS potencia el aumento contráctil producido por los agonistas β -adrenérgicos en modelos animales¹⁶ y en pacientes con IC^{9,28,29}. Sin embargo, resulta lógico suponer que el NO es tan solo uno de los factores que regulan la respuesta a los agonistas β -adrenérgicos en el paciente con IC³⁰. No obstante, en determinadas circunstancias el aumento de NO sintetizado tras la inducción de la NOS2 puede ser beneficioso ya que mejora la relajación ventricular^{6,22} reduce el MVO₂³¹, la respuesta a la estimulación β -adrenérgica^{8,11,15} y aumenta la angiogénesis³². En cardiomiocitos de pacientes con trasplante cardíaco, el isoproterenol produce un discreto aumento de la contractilidad y frecuencia cardíaca, y donde la inhibición de NOS2 normaliza ambas respuestas, así como el tránsito de Ca⁺⁺. Sin embargo, la inhibición de 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 es pobre¹⁴. Es decir, en pacientes con IC la expresión de 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 retículo sarcoplásmico a través de una vía independiente del GMPc, pero relacionada con modificaciones del estado redox celular producidas por el peroxinitrito³³. En ratones en los que se sobreexpresa NOS2 cardíaca aumenta la generación de peroxinitrito y se observa dilatación, hipertrofia y fibrosis cardíaca; más aún, aunque raramente desarrollan IC, sí presentan una alta incidencia de muerte súbita asociada con bradiarritmias³⁴. Por otro lado, ratones con sobreexpresión de NOS2 presentan un genotipo normal, ya que el NO producido es neutralizado por la mioglobina citoplasmática; mientras que por el contrario, cuando se repiten estos experimentos en ratones carentes de mioglobina, los animales presentan hipertrofia, fibrosis intersticial y dilatación ventricular³⁵.

Como fuera mencionado, durante la IC aumentan las vías enzimáticas que producen radicales libres y se alteran también las enzimas productoras de NO (NOSs y XO),

lo que produce vasoconstricción y desacople mecanoenergético. De hecho, en modelos animales, la transición hacia la IC descompensada implica un déficit de NOS1 y NOS3 –y por ende– en la síntesis cardíaca de NO, más un aumento en la actividad de la XO⁴. El NO también regula una Nox que inhibe la liberación de Ca⁺⁺ por el retículo sarcoplásmico, 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 catión Ca⁺⁺. La XO, una importante fuente de radical superóxido, aumenta en el miocardio y los vasos de los pacientes con IC³⁶, produciendo disfunción endotelial, depresión de la función cardíaca, desacople mecánico-energético y apoptosis^{37,38}. La inhibición de XO con allopurinol mejora la eficiencia mecánica, el remodelado postinfarto de miocardio y la respuesta a las catecolaminas³⁹. Aquí se destaca que los efectos del allopurinol se suprimen al bloquear NOS con L-NAME (inhibidor específico) y los de esta con alopurinol³⁸, lo que indica que existiría interacción entre ambas vías de señalización⁴. Por otro lado, algunos fármacos como las estatinas⁴⁰ y los IECA⁴¹ utilizados en IC, 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 (fig. 1).

Por otro lado, el NO tiene también un importante rol sobre los canales iónicos cardíacos, en la génesis de las arritmias cardíacas, en la apoptosis cardíaca, el preconditionamiento isquémico, la isquemia cardíaca y la función mitocondrial. En donde el daño o beneficio que NO modularía, dependerá del tipo y condición celular. Así, altas concentraciones inducen muerte celular durante la injuria isquémica y como consecuencia de enfermedades neurodegenerativas⁴²⁻⁴⁴.

La citotoxicidad atribuida al NO involucra la generación de peroxinitrito producida por la reacción de difusión controlada entre NO y el anión superóxido. El peroxinitrito interactúa con lípidos, DNA y proteínas, vía reacción oxidativa directa o indirecta por mecanismos mediados por radicales. Estas reacciones disparan respuestas celulares que van desde modulaciones sutiles de señalización celular a una abrumadora injuria oxidativa llevando a necrosis o apoptosis celular. El peroxinitrito resulta crucial en condiciones tales como stroke, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica (ICC), diabetes, shock cardiogénico, enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer y enfermedades neurodegenerativas⁴⁵.

El efecto cardioprotector responde al menos en parte a la vía que involucra la kinasa G (GMP/proteína PKG)^{46,47}. Donde NO activa una guanilato ciclasa soluble que cataliza la síntesis de cGMP a partir de GTP. Además, NO participa en mecanismos de acciones antiapoptóticas mediadas por PKG, y estos son un área activa de investigación y donde la modulación de dichas vías tendrían importantes implicancias terapéuticas.

Factores relacionados a óxido nítrico como biomarcadores en la insuficiencia cardíaca

En pacientes con falla cardíaca crónica, ha sido claramente demostrado el incremento en la producción de ERO y donde se destaca al O⁻. La evidencia demuestra el papel de las

ERO, junto con las ERN en la fisiopatología de la ECV. Por lo que se evalúan múltiples biomarcadores de estrés oxidativo que resultan comunes a ambos sistemas. De ellos, la Nox representa al sistema más eficiente y mayor fuente productora de ERO durante la IC. La activación anormal del RAS con impacto en la inducción de la apoptosis y fibrosis, resulta como consecuencia de la generación de ERO por Nox y es propio de las EVC^{48,49}. Al respecto, se ha enfatizado sobre alteraciones de la vías de señalización ERO-Nox-dependiente, como un importante factor responsable del desarrollo de muchos procesos patológicos cardíacos. Así, las Nox son la mayor fuente productora de O⁻ en células vasculares y miocitos, donde comparten algunas de las características de las enzimas presentes en los neutrófilos. En respuesta a factores de crecimiento y citoquinas, producen O⁻ que puede ser metabolizado a peróxido de hidrógeno. Estas dos especies reactivas del oxígeno sirven como segundos mensajeros para activar múltiples vías de señalización intracelular. Además de la Nox de los miocitos, también existe una Nox vascular que ha sido reconocida esencial en la respuesta fisiológica de las células vasculares, incluyendo el crecimiento, migración y modificación de la matriz extracelular. Además, también se la ha relacionado con HTA y estados patológicos asociados a crecimiento descontrolado e inflamación, tal como la aterosclerosis. En el caso de sobrecarga de presión se activa la producción de Ang II miocárdica, la cual estimula vías de señalización intracelular que activan la respuesta hipertrófica, tal y como lo realiza Nox⁵⁰.

Nox tiene diversos constituyentes o subunidades que resultan relevantes por su relación con la ECV, siendo en orden de importancia la Nox2, Nox4 y Nox1 y las subunidades gp91phox, p22phox, p47phox y Rac1. Estas desempeñan un importante rol en la injuria cardíaca, participando en la producción de hipertrofia cardíaca, produciendo respuestas celulares opuestas, acelerando el proceso aterosclerótico, HTA y la remodelación miocárdica, activándose en IC y post-IAM⁵⁰⁻⁵².

Más específicamente, Esposito et al.⁵³ evaluaron ratones a los cuales se les había eliminado Rac1 y llegaron a la conclusión de que esto previno la hipertrofia inducida por Ang II. Rac1 iniciaba la respuesta hipertrófica dependiente de ERO generada por Nox en corazón⁵⁴, confirmándose que la producción de O⁻ por la subunidad Rac1 de Nox2, inició la activación de proteína quinasa B (Akt) como componente de esta vía de señalización e inducida por Ang II para la hipertrofia de los cardiomiocitos⁵⁵.

La investigación básica provee evidencias sobre Nox2 como responsable de la producción vascular de ERO, de una menor biodisponibilidad de NO y del desarrollo de las lesiones precoces en las aortas de ratones⁵⁶. Un hallazgo adicional agrega la participación del factor transformador de crecimiento beta (TGF-β) circulante y de la apolipoproteína E, y en donde el aumento de TGF-β indujo la activación de Nox y sobreproducción de ERO acelerando el proceso aterosclerótico, la HTA y la remodelación miocárdica en ratones deficientes en apolipoproteína E⁵⁷.

Por otro lado, una elevada expresión de Nox y O⁻ fueron también descritas en carótidas de conejos con ICC⁵⁸ y específicamente en la actividad de la subunidad p47phox de Nox2 en VI de ratones después del infarto de miocardio (IM)⁵⁹.

Mientras que Nox2 está involucrada en la HVI inducida por angiotensina II, Nox4, también lo estuvo aparentemente en la sobrecarga de presión en miocardio murino⁶⁰. Esta isoforma entonces aunque con controversias, también desempeñaría un importante rol en la ECV. Fue sugerido que Nox4 estaba unida a la proteína p22phox sobre la membrana interna en las células epiteliales. También se halló –en contraste con otras isoformas de NADPH oxidasa– que Nox4 producía principalmente peróxido de hidrógeno y una muy pequeña cantidad de $O^{\cdot -}$. Proteínas citosólicas oxidadas o GTPasa Rac no fueron requeridas para la actividad de esta enzima⁶¹. En este sentido, existe alguna evidencia mencionando que si bien Nox4 produjo peróxido de hidrógeno, también generó $O^{\cdot -}$ intracelularmente⁶². Pero sigue existiendo mucha incertidumbre sobre la producción de ERO-Nox4-dependiente. Por ello, el estado actual del conocimiento a este respecto refiere que Nox4 produce principalmente peróxido de hidrógeno y no $O^{\cdot -}$ contradiciendo a la mayoría de otros datos experimentales. Una explicación factible sería el uso de métodos no fiables tales como la reducción de nitroblue tetrazolium para la detección de $O^{\cdot -}$ ⁶¹⁻⁶³. Por otro lado, el empleo de métodos específicos y precisos como la quimioluminiscencia para detección de $O^{\cdot -}$ arrojaron diferentes resultados⁶⁴. Por ejemplo, con lucigenina quimioluminiscencia se encontró que Nox4 y Nox2 producían aproximadamente el 75% de $O^{\cdot -}$ en las arterias coronarias de pacientes con enfermedad arterial coronaria⁶⁵.

Nox4 está localizada en diferentes sitios –dentro de las células cardíacas– en comparación con otras Nox; en especial se la ubica en mitocondria y donde representa una fuente mayoritaria de producción de $O^{\cdot -}$ en miocitos. Puede provocar disfunción mitocondrial, apoptosis, disfunción ventricular izquierda en respuesta a sobrecarga de presión y paradójicamente también produciría adaptación cardíaca al estrés crónico⁶⁶. En ratones añosos bajo estimulación hipertrofica con sobrecarga de presión, Nox4 fue estimulada y esto incrementó la producción de $O^{\cdot -}$ e indujo disfunción cardíaca con fibrosis y apoptosis⁶⁷.

En contraste con otras isoformas de NADPH oxidasa, la estimulación de Nox4 en cardiomiocitos condicionó protección contra el remodelado cardíaco inducido por sobrecarga de presión. Los autores justifican estos resultados por la preservación de la densidad capilar del miocardio inducida por Nox4 a través de la activación del factor inducible 1 (Hif1) de hipoxia y de la producción de factor de crecimiento del endotelio vascular. Ellos también mostraron que la localización de Nox4 en los cardiomiocitos, no fue mitocondrial, sino en el retículo endoplásmico perinuclear. Estos hallazgos contradicen los de otros autores⁶⁶. Apareciendo resultados contradictorios concernientes a los efectos sobre el estrés oxidativo y sobre su localización. El origen de estas diferencias requiere mayor investigación⁶⁸ porque se oponen a la mayoría de los hallazgos sobre los efectos de Nox en cardiomiocitos y otras células.

En contraste con las implicancias de Nox en las enfermedades cardíacas, la participación de XO en la injuria cardíaca ERO-dependiente causó originalmente muchas dudas. La XO y la xantina deshidrogenasa (XDH) son las formas oxidada y reducida de xantino-oxidoreductasa (XOR). XO fue considerada como la mayor fuente productora de $O^{\cdot -}$

y peróxido de hidrógeno; su mecanismo fue inicialmente bien establecido⁶³. Paradójicamente, estudios subsecuentes descubrieron una pobre actividad de XO en corazones de animales y humanos^{69,70}.

Sin embargo, en la actualidad existe acuerdo sobre aumento en los niveles de XO y su actividad en el sistema cardiovascular bajo condiciones patológicas, pero que no pueden ser fácilmente detectados en condiciones fisiológicas. Así Thompson-Gorman y Zweier midieron la generación de ERO mediado por XO en corazón aislado de rata⁷¹. Ellos hallaron que XO fue un importante factor de daño oxidativo por isquemia/reperfusión en corazón de rata. En este sentido, se ha demostrado también que el aumento en la producción de ERO catalizada por XO durante la isquemia/reperfusión resulta del incremento de la concentración del sustrato (xantina e hipoxantina) debido a la degradación de ATP durante la isquemia⁷². Ashraf y Samra también sugirieron que la actividad de XO aumenta durante la isquemia y se intensificó después de la reperfusión⁷³. XO se localiza en células intersticiales, endotelio vascular coronario y células musculares lisas. De Jong et al.⁷⁴ mostraron que la producción de ERO por xantino óxidoreductasa (XOR) aumentó en la IC pero no en la hipertrofia cardíaca.

Similarmente a las NADPH oxidasas, la XO condicionó a muchos desórdenes cardíacos ERO-dependientes como deterioro de la vasodilatación mediada por endotelio, aumento de la actividad de XO en MCD, disminución de NO en pacientes con enfermedad coronaria, disfunción endotelial coronaria y efecto tóxico de $O^{\cdot -}$ generado por XO en corazón. Además, el aumento de la actividad de XO y la disminución de la actividad superóxido dismutasa extracelular (ecSOD) deterioraron la vasodilatación mediada por endotelio en pacientes con IC⁷⁵. Al respecto, trabajos posteriores determinaron los niveles de la proteína XO y $O^{\cdot -}$ dependiente de XO inducidas por Ang II en células endoteliales de pacientes con enfermedad coronaria⁷⁶, sugiriéndose que la Ang II promueve sobreproducción de $O^{\cdot -}$ por activación de XO redox-sensible. También, estudios básicos confirmaron el rol de XO, encontrándose que su actividad estaba elevada en MCD⁷⁷ y que la inhibición crónica de XO por allopurinol suprimía la progresión de IC en MCD.

También ratas con IC por HTA espontánea exhibieron aumento de la expresión de ARNm y de la actividad de XOR, mientras que la inhibición de XOR causó reversión del remodelado en IC por HTA espontánea y MCD dilatada⁷⁸. La XOR y Nox también aumentan la formación $O^{\cdot -}$ cardíaco ratas Dahl hipertensas sal-sensibles con IC diastólica⁷⁹.

Las ERO producidas por XO redujeron la biodisponibilidad de NO coronario en pacientes con EAC⁸⁰. Del mismo modo, en modelo murino la isquemia/reperfusión miocárdica aumentó la expresión de factor de necrosis tumoral (TNF- α) e indujo activación de XO y generación de $O^{\cdot -}$ llevando a la disfunción del endotelio coronario⁸¹. Adicionalmente, se demostró también otro efecto tóxico de $O^{\cdot -}$ generado por XO en corazón de ratas con IC espontáneamente hipertensa con MCD. Específicamente, el $O^{\cdot -}$ deterioró la S-nitrosilación del receptor de rianodina (RyR) siendo responsable del escape de calcio desde el retículo sarcoplásmico en músculo esquelético⁸².

De particular interés y amplio reconocimiento, la disfunción mitocondrial resulta una esencial fuente productora

de ERO en la ECV por lo que la mitocondria permanece en constante estudio. De hecho, se estableció que el O^- generado por la mitocondria resulta como consecuencia a la liberación de electrones transportadores de la cadena respiratoria (complejos I y III)⁸³. Muchos autores confirmaron la importancia de la sobreproducción de ERO mitocondrial en el corazón dañado (miocardio insuficiente, isquemia, isquemia/reperusión, disfunción endotelial coronaria producida por superóxido en IC congestiva, progresión de HVI a HP e IC derecha, daño mitocondrial y de VI, y por último arritmias).

Originalmente, el complejo mitocondrial I fue descrito como una fuente potencial de ERO en miocardio de perros con IC⁸⁴. También, en mitocondrias de corazón aislado de ratón, la isquemia aumentó la producción de ERO⁸⁵. La producción de O^- mitocondrial en corazón dañado también puede inducir alteración del complejo II en miocardio postisquémico en ratas sujetas a ligadura coronaria seguida de reperusión⁸⁶. De interés, la injuria por isquemia/reperusión con ablación de la proteína p66 (Shc) en corazón de ratón tiene un rol clave en la formación de ERO mitocondrial⁸⁷. Al respecto, la despolarización mitocondrial y el aumento de la producción de ERO mediada por la lipoxigenasa y el ácido araquidónico indujo arritmias por isquemia/reperusión⁸⁸. Además, el aumento en la producción de O^- mitocondrial fue responsable de disfunción endotelial coronaria y de la disminución del flujo coronario en IC congestiva⁸⁹.

Para destacar, estudios realizados durante la progresión de la HVI a la IC congestiva demostraron que la Nox mitocondrial fue la principal fuente productora de ERO –especialmente en el fallo ventricular derecho inducido por HTA–; y sorprendentemente, el aumento de la actividad del complejo mitocondrial II fue el mecanismo responsable y no de los complejos I y III, reconocidos como los mayores productores de ERO mitocondrial. Este aporte fue particularmente relevante para la producción de ERO ventricular en la IC⁹⁰. Sin embargo, Mariappan et al.⁹¹ demostraron que la producción de O^- mitocondrial inducido por TNF- α , aumentó la actividad del complejo I de la cadena respiratoria lo que produjo daño mitocondrial en VI de ratas. Todos estos hallazgos sugieren que la sobreproducción de ERO, por la mitocondria, representan un origen causal en las enfermedades cardíacas.

Por lo expuesto, resulta claro que la ECV se asocia con un estado crónico de estrés oxidativo e inflamación mediado por vías complejas de señalización que se encuentran interconectadas. Más específicamente, la IC cursa con disfunción mitocondrial, sobreproducción de ERO, activación del RAS vinculada a mayor actividad de NADPH oxidasa y reducción del NO (fig. 1). De interés, ha sido demostrado que la menor biodisponibilidad del NO induce la expresión de proteínas de respuesta a golpe de calor tales como Hsp70, lo que condiciona efectos beneficiosos contra la lesión por estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis. La inducción de proteínas de golpe de calor como respuesta a daño por exaltación del sistema RAS y/o déficit de NO, fue originalmente sugerido por Bravo et al.⁹².

Actualmente se conoce que las proteínas de choque térmico están elevadas en plasma de pacientes con ECV, sin embargo no se comprende aún por completo su papel fisiológico y menos su valor para predecir el desarrollo y/o progresión de la enfermedad. En particular, fue sugerido que

los niveles circulantes de Hsp70 podrían indicar la presencia / progresión de la aterosclerosis en sujetos con hipertensión establecida, y además una posibilidad intrigante que plantean los autores es que Hsp70 podría proteger contra el daño oxidativo e inflamatorio en este grupo de sujetos⁹³. En este sentido, recientemente ha sido propuesto que Hsp70 sería un potencial biomarcador y objetivo terapéutico en patologías como cáncer, ECV, neurológicas y hepáticas⁹⁴.

Por otro lado, fue informado que bajos niveles de Hsp70 se relacionarían con un estado cardiovascular saludable y se sugirió como predictor de longevidad⁹⁵. Con estos antecedentes, Hsp70 fue investigada en pacientes con ICC intentando establecer relación entre gravedad y supervivencia. Aquí se encontró elevación en los niveles de Hsp70 particularmente en aquellos con caquexia cardíaca y por ello pudo ser relacionada con la gravedad de la enfermedad; sin embargo, no con la supervivencia⁹⁶. Por lo tanto, la importancia de la relación de la expresión de Hsp70 y la morbilidad en ICC requiere mayor estudio.

Conclusiones y perspectivas

La IC es, en casi todos los casos, el resultado final de la enfermedad cardíaca primaria y cualquier causa de deterioro estructural del corazón, resultando una de las ECV más prevalentes. Dicha condición la posiciona como una de las principales causas de morbimortalidad prematura en la mayoría de los países industrializados y en vías de desarrollo. De especial interés, existe evidencia obtenida de fuentes como estudios epidemiológicos, prospectivos de cohorte e intervención, que sugieren que esta patología se asocia con alteraciones de la función endotelial, metabolismo oxidativo, inflamación y apoptosis. Entre los factores determinantes de tales alteraciones se destacan la actividad de SOD, fosforilación y expresión de enzimas productoras del NO, aumento de la actividad de la glutatión peroxidasa, activación de NADPH oxidasa y expresión de p22phox, entre los factores más relevantes.

En consistencia, la literatura destaca que pacientes con IC presentan alteración en las vías de señalización promotoras del estrés oxidativo e inflamación. Específicamente incremento de las ERO con aumento de la actividad de NADPH y déficit de la actividad de SOD. Esto fue recientemente evidenciado por nuestro laboratorio⁹⁷. Por otro lado, en este mismo contexto fueron informados bajos niveles del NO. Estos podrían responder a interacción con ERO, menor producción del sistema o una suma de ambas situaciones. Si bien existe abundante bibliografía sobre alteración en las vías de señalización de NO, Nox-ERO y SOD en investigación básica, son pocos los que refieren su impacto en cuanto a su correlato en la clínica. No obstante el conocimiento actual y transcurridos más de 20 años desde la identificación de las funciones del NO endógeno, resultan infructuosos los intentos por generar nuevas estrategias terapéuticas, reflejando un lento progreso del conocimiento sobre posibles biomarcadores relacionados.

La alteración y/o desacople de Nox, ERO y SOD condiciona a múltiples vías de señalización que involucran la producción de HVI, falla miocárdica, progresión de la IC a falla cardíaca derecha, alteraciones de la función endotelial y de la vasomotilidad de las arterias coronarias e injuria

de reperfusión y arritmias, todos componentes del continuo cardiovascular. En este contexto, el NO resulta clave en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y por lo tanto, una alteración en su biodisponibilidad claramente se asocia con ECV. Existe evidencia sustancial –y puesta de manifiesto en esta revisión– que las ERO mayoritariamente generadas a partir de NADPH oxidasa serían responsables primarios de la reducción en la biodisponibilidad de NO. Así, el O^- podrá interactuar con el ON para producir peroxinitrito que a su vez puede dar lugar a otras especies reactivas. Particularmente, el incremento del estrés oxidativo durante la IC podría resultar del desacople funcional de la cadena respiratoria como consecuencia de una capacidad antioxidante deteriorada (disminución de la actividad de SOD y/o estimulación de fuentes enzimáticas incluyendo NADPH oxidasas).

La propuesta de evaluar al NO como biomarcador en IC, planteada por nuestro grupo de trabajo y otros, respondería al supuesto de que este factor participa en aspectos relevantes fisiopatológicos de la misma. De hecho, en IC existe desequilibrio NO/redox con aumento de las vías enzimáticas que producen radicales libres (NADPH oxidasas, XO cardíaca, enzimas mitocondriales, hemoglobina oxidada en los eritrocitos, etc.) que oxidan las proteínas que participan en el acoplamiento excitación-contracción e inactivan al NO y alteran la actividad y localización de las enzimas productoras del mismo. Ello conduce a un desacople funcional caracterizado por una reducción de la contracción que no se acompaña de una reducción similar en el consumo de energía. Todo ello, también condiciona una marcada activación neurohumoral y un aumento de citocinas proinflamatorias. En este sentido, muy recientemente ha sido sugerido que una baja biodisponibilidad del NO induce a la expresión de proteínas de respuesta a estrés oxidativo como la Hsp70 lo que promueve efectos protectores contra la lesión –no solo por estrés oxidativo–, sino también por inflamación y apoptosis. De hecho, nuestro laboratorio sugirió que Hsp70 podría utilizarse como un posible biomarcador de daño oxidativo-inflamatorio⁹⁸. En consistencia, estudios recientes sugieren que las proteínas de choque térmico desempeñan un papel clave en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares incluyendo la IC. Al respecto, no está claro si los niveles circulantes de proteína Hsp70 están relacionados con factores de riesgo cardiovascular, índices ecocardiográficos de remodelado del VI y/o prevalencia de ECV⁹⁹. Sin embargo, el análisis de resultados preliminares de nuestro laboratorio sugiere que los pacientes con IC también presentan elevación de marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, IL-6 y TNF α), mientras que Hsp70 se encontró reducida respecto a los pacientes sanos. En consecuencia, la determinación de los marcadores oxidativos como los generales inflamatorios en plasma, nos permitieron caracterizar a pacientes sanos de los pacientes con IC. Inéditos y controversiales fueron estos hallazgos de menores niveles de Hsp70 en plasmas de pacientes con IC y que presentan bajos niveles de NO. Más compleja aún resulta la interpretación de nuestros resultados desde que se conocen las acciones opuestas que presenta Hsp70 a nivel extracelular versus intracelular, sobre la activación de la vía inflamatoria por NF- κ B¹⁰⁰. Sin embargo, con relación a estrés oxidativo e inflamación, resulta válido considerar la diferencia entre eventos agudos y crónicos sobre el deterioro en la capacidad de respuesta biológica frente a estas injurias (IC aguda versus IC crónica).

Al respecto, previos reportes estudiaron dichas diferencias y demostraron –en fase crónica– que el aumento de la peroxidación lipídica a través de niveles más altos de TBARS y el aumento del estrés oxidativo produjeron una reducción de la actividad antioxidante total y una mayor actividad de NADPH oxidasa. Esto fue demostrado por Rinaldi Tosi et al., y que además se acompañó de una disminución de la expresión de la isoforma inducible de Hsp70¹⁰¹. Por lo tanto, mayores estudios deberán conducirse con especial atención en IC y modelos relacionados para profundizar la comprensión de estas vías de señalización alteradas.

Financiación

Este trabajo fue económicamente apoyado por subsidios para investigación de la Secretaría de Ciencia, Técnica y Postgrado de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina; y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina, Ambos, otorgados al Dr. Walter Manucha (PICT 0234-BID 2777 OC/AR).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Richards AM. What we may expect from biomarkers in heart failure. *Heart Fail Clin.* 2009;5:463–70.
2. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 2008;358:2148–59.
3. Drexler H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a doubled-edged sword? *Circulation.* 1999;99:2972–5.
4. Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest.* 2005;115:509–17.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.* 2003;93:388–98.
9. 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.
10. 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.
11. Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:719–29.
12. 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.

13. 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 postpartum cardiomyopathy but not in ischaemic or valvular heart disease. *Br Heart J*. 1995;74:426–30.
14. Ziolo MT, Maier LS, Piacentino V 3rd, Bossuyt J, Houser SR, Bers DM. Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta-adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca²⁺ transients. *Circulation*. 2004;109:1886–91.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, et al. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104:1286–91.
21. 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.
22. 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.
23. Paulus WJ. The role of nitric oxide in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2001;6:105–18.
24. 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.
25. 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.
26. Takimoto Y, Aoyama T, Tanaka K, Keyamura R, Yui Y, Sasayama S. Augmented expression of neuronal nitric oxide synthase in the atria parasymphatically decreases heart rate during acute myocardial infarction in rats. *Circulation*. 2002;105:490–6.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca²⁺ sparks: influence of β -adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H2295–303.
34. 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.
35. Godecke A, Molojavvi A, Heger J, Flogel 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.
36. 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.
37. Saavedra WF, Paolucci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, et al. 2002. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoelectric uncoupling in the failing heart. *Circ Res*. 2002;90:297–304.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 2003;140–141:113–24.
43. Duncan AJ, Heales SJR. Nitric Oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 2005; 26:67–69.
44. Ciani E, Guidi S, Bartesaghi R. Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for the survival role of nitric oxide. *J Neurochem*. 2002;1282–9.
45. Fiscus RR. Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in regulation of apoptosis and survival in neuronal cells. *Neurosignals*. 2002;11:175–90.

46. Nagai-Kusuhara A, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Negi A, Seigel GM. cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent antiapoptotic-signal induced by oxide nitric in retinal-neuro-glial progenitor cells. *Exp Eye Res.* 2007; 84: 152-62.
47. Tawfik HE, Cena J, Schulz R, Kaufman S. Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H1736-42.
48. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Cir Res.* 2000;86:494-501.
49. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodeling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006;71:208-15.
50. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension.* 2002;40:477-84.
51. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 2002;105:293-6.
52. Nakagami H, Takemoto M, Liao JK. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:851-9.
53. Esposito G, Prasad SVN, Rapacciuolo A, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. Cardiac overexpression of a Gq inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulates kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activity in In Vivo pressure overload. *Circulation.* 2001;103:1453-8.
54. Satoh M, Ogita H, Takeshita K, Mukai Y, Kwiatkowski DJ, Liao JK. Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7432-7.
55. Hingtgen SD, Tian X, Yang J, Dunlay SM, Peek AS, Wu Y, et al. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological Genomics.* 2006;26:180-91.
56. Judkins CP, Diep H, Broughton BRS, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE-/- mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H24-32.
57. Buday A, Orsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, et al. Elevated systemic TGF- β impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE-/- mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H386-95.
58. Li YL, Gao L, Zucker IH, Schultz HD. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-enhanced carotid body chemoreceptor sensitivity in heart failure rabbits. *Cardiovasc Res.* 2007;75:546-54.
59. Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, et al. Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Cir Res.* 2007;100:894-903.
60. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Cir Res.* 2003;93(9):802-804.
61. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal.* 2006;18:69-82.
62. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J.* 2007;406:105-14.
63. Denisov ET, Afanas'ev IB. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group; 2005.
64. Afanasev I. Detection of superoxide in cells, tissues and whole organisms. *Front Biosci (Elite Edition).* 2009;1:153-60.
65. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P, et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:333-9.
66. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:15565-70.
67. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation Research.* 2010;106:1253-64.
68. Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:18121-6.
69. Downey JM, Miura T, Eddy LJ, Chambers DE, Mellert T, Hearse DJ, et al. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19:1053-60.
70. Grum CM, Gallagher KP, Kirsh MM, Shlafer M. Absence of detectable xanthine oxidase in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:263-7.
71. Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1990;265:6656-63.
72. Xia Y, Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postschemic heart. *J Biol Chem.* 1995;270:18797-803.
73. Ashraf M, Samra ZQ. Subcellular distribution of xanthine oxidase during cardiac ischemia and reperfusion: an immunocytochemical study. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1993;25:193-201.
74. De Jong JW, Schoemaker RG, de Jonge R, Bernocchi P, Keijzer E, Harrison R, et al. Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2083-9.
75. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, 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.
76. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, et al. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:943-8.
77. Duncan JG, Ravi R, Stull LB, Murphy AM. Chronic xanthine oxidase inhibition prevents myofibrillar protein oxidation and preserves cardiac function in a transgenic mouse model of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1512-8.
78. Minhas KM, Saraiva RM, Schuleri KH, Lehrke S, Zheng M, Saliaris AP, et al. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Cir Res.* 2006;98:271-9.
79. Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, et al. Role of xanthine oxidoreductase in the reversal of diastolic heart failure by candesartan in the salt-sensitive hypertensive rat. *Hypertension.* 2007;50:657-62.
80. Baldus S, Köster R, Chumley P, Heitzer T, Rudolph V, Ostad MA, et al. Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:1184-90.

81. Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, et al. TNF- α contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:475–80.
82. Gonzalez DR, Treuer AV, Castellanos J, Dulce RA, Hare JM. Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure. *J Biol Chem.* 2010;285:28938–45.
83. Afanas'ev IB. Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press/Taylor & Francis; 2009.
84. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999;85:357–63.
85. Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294:C460–6.
86. Chen YR, Chen CL, Pfeiffer DR, Zweier JL. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem.* 2007;282:32640–54.
87. Carpi A, Menabò R, Kaludercic N, Pelicci P, di Lisa F, Giorgio M. The cardioprotective effects elicited by p66Shc ablation demonstrate the crucial role of mitochondrial ROS formation in ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787:774–80.
88. Haworth RA, Potter KT, Russell DC. Role of arachidonic acid, lipoxygenase, and mitochondrial depolarization in reperfusion arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H165–74.
89. Chen Y, Hou M, Li Y, Traverse JH, Zhang O, Salvemini D, et al. Increased superoxide production causes coronary endothelial dysfunction and depressed oxygen consumption in the failing heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H133–41.
90. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, van Hardeveld C, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res.* 2007;75:770–81.
91. Mariappan N, Elks CM, Fink B, Francis J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:462–70.
92. Bravo J, Quiroz Y, Pons H, Parra G, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, et al. Vimentin and heat shock protein expression are induced in the kidney by angiotensin and by nitric oxide inhibition. *Kidney Int Suppl.* 2003 Oct:546–51.
93. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegård J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension.* 2003;42:235–8.
94. Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012;136:354–74.
95. Terry DF, McCormick M, Andersen S, Pennington J, Schoenhofen E, Palaima E, et al. Cardiovascular disease delay in centenarian offspring: role of heat shock proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019:502–5.
96. Genth-Zotz S, Bolger AP, Kalra PR, von Haehling S, Doehner W, Coats AJ, et al. Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival. *Int J Cardiol.* 2004;96:397–401.
97. Bonafede RJ, Calvo JP, Fausti JMV, Puebla S, Gambarte AJ, Manucha W. Nitric oxide: A new possible biomarker in heart failure? Relationship with pulmonary hypertension secondary to left heart failure. *Clin Investig Arterioscler.* 2017;29:120–6.
98. Molina MN, Ferder L, Manucha W. Emerging role of nitric oxide and heat shock proteins in insulin resistance. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18:1, <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-015-0615-4>.
99. Dhingra R, Larson MG, Benjamin EJ, Lipinska I, Gona P, Corey D, et al. Cross-sectional correlates of serum heat shock protein 70 in the community. *Am J Hypertens.* 2006;19:227–31, discussion 232–3.
100. Mazzei L, Docherty NG, Manucha W. Mediators and mechanisms of heat shock protein 70 based cytoprotection in obstructive nephropathy. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20:893–906.
101. Rinaldi Tosi ME, Bocanegra V, Manucha W, Gil Lorenzo A, Vallés PG. The Nrf2-Keap1 cellular defense pathway and heat shock protein 70 (Hsp70) response Role in protection against oxidative stress in early neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO). *Cell Stress Chaperones.* 2011;16:57–68.