

BASES MOLECULARS DE LA MIOCARDIOPATIA

DILATADA IDIOPÀTICA. EXPRESSIÓ DE LA

SINTASA INDUÏBLE DE L'ÒXID NÍTRIC I

POSSIBLE PAPER DE LES CITOQUINES

EN AQUESTA EXPRESSIÓ

Tesi presentada per

Josefina Orús i Puigvert

Per optar al grau de

Doctor en Medicina

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Ginés Sanz i Romero i la Dra. Magda Heras i Fortuny, a l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Els sotasignants Dr. Ginés Sanz i Romero, Professor Titular de Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i la Dra. Magda Heras i Fortuny,

CERTIFIQUEN: que la Tesi Doctoral BASES MOLECULARS DE LA MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÀTICA. EXPRESSIÓ DE LA SINTASA INDUÏBLE DE L'ÒXID NÍTRIC I POSSIBLE PAPER DE LES CITOQUINES EN AQUESTA EXPRESSIÓ, presentada per Josefina Orús i Puigvert, per optar al grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la seva direcció i assoleix els requisits necessaris per a ser llegida davant el corresponent Tribunal.

El que es fa constar a Barcelona a l'any dos mil tres.

Prof. Ginés Sanz i Romero

Dra. Magda Heras i Fortuny

Al Jaume i als meus fills

Als meus pares i germanes.

A tota la meva família.

Al mirar enrera i repassar totes les persones que d'una o altra manera han participat de la feina exposada en aquesta tesi me n'adono que són moltes i molt importants per a mi. Voldria aprofitar aquesta ocasió per manifestar el meu més sincer agraïment a totes aquestes persones i de forma especial a:

Al Dr. Ginés Sanz i la Dra. Magda Heras per ser els directors d'aquesta tesi i per confiar en mi des del primer moment sense deixar de fer-ho en cap ocasió. Per dedicar-me temps i paciència en aquesta trajectòria.

Al Dr. Jordi Soler-Soler i a la Dra. Pilar Tornos per ensenyar-me les bases de la cardiologia i trametre'm la seva il·lusió per la clínica.

A la Dra. Eulàlia Roig per trametre'm el seu entusiasme per la insuficiència cardíaca i el trasplantament. Per la seva ajuda incondicional en aquesta tesi.

A tots els metges del IMCV pel que m'han ensenyat, ajudat i hem compartit.

A tot el personal d'infermeria del IMCV, per la seva gran professionalitat i per estar sempre disposats a ajudar-me en qualsevol cosa.

Als companys de Residència i als altres residents que m'han seguit, per compartir moments bons i no tan bons i sobretot per la seva amistat.

Al Manel Morales Ruiz i a l'Alberto Leivas per presentar-me l'ADN al laboratori i allisonar-me a agafar una pipeta. A tot el personal del Laboratori d'Hormonal per la seva col·laboració desinteressada,

Al Dr. Wladimiro Jiménez per introduir-me al camp de la Biologia molecular i confiar en mi.

Al Dr. Filella per introduir-me al món de les citoquines i haver col·laborat amb nosaltres en tot moment.

Al Dr. Casademont, Dr. Miró i a la Diana Jarreta per la seva important col·laboració en aprofundir l'estudi a nivell mitocondrial.

Al Dr. M. Ballester, Drs. N. Manito, J. Roca i E. Castells, Dr. Epelde, Dra. Cabré, Dr. Mañalich per fer possible la recollida de les mostres de miocardi.

A la Mònica Sabaté, Valentí Xirinachs, Montse Vázquez, Laura González i Cristina Siles per la seva ajuda en la confecció final de la tesi.

A tots els pacients que han col·laborat desinteressadament en aquest projecte.

Al Jaume per fer-me costat en qualsevol situació i per la seva paciència infinita.

A l'Oriol, al Jaume i l'Albert per fer-me riure cada dia i per ensenyar-me el que vol dir no perdre ni un minut de temps.

Als meus pares per fer-me veure des de petita la importància dels estudis i perquè sempre donen més del que esperen rebre.

Agraïments Institucionals

A la Generalitat de Catalunya (CIRIT; FIAP; FI-SQV / 96 – 99).

Al FIS 96 / 1999 – 02.

A l'Hospital Clínic per la Beca de fi de Residència (1996).

A la Sociedad Española de Cardiología (1997).

A la Caixa d'Estalvis de Sabadell.

ÍNDEX

ABREVIATURES.....	VIII
ARTICLES QUE COMPONEN AQUESTA TESI.....	XI
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. ANTECEDENTS.....	2
1.1.1. Inflamació i citoquines	2
1.1.2. Òxid nítric	2
1.2. MIOCARDIOPATIES DILATADES	4
1.2.1. Anatomia patològica	4
1.2.2. Etiologia.....	6
1.2.2.1. Miocarditis viral i MCD	6
1.2.2.2. Mecanismes immunològics	7
1.2.2.3. Factors familiars, genètics i moleculars	8
1.2.2.4. Mecanismes neurohormonals	9
1.2.2.4.1. Sistema renina-angiotensina	10
1.2.2.4.2. Vasopressina	11
1.2.2.4.3. Factors natriurètics	11
1.2.2.5. Paper de les citoquines.....	11
1.2.2.6. Endotelina	13
1.2.2.7. Factor de relaxació derivat de l'endoteli.....	14
1.3. ÒXID NÍTRIC.....	15
1.3.1. Bioquímica del NO.....	15
1.3.2. Isoformes de NOS.....	17
1.3.2.1. Activació enzimàtica de les isoformes de NOS.....	18
1.3.2.2. Efecte de la tetrahidrobiopterina a l'activació del NOS.....	20
1.3.2.3. Regulació específica de les diferents isoformes de NOS mitjançant la calmodulina.....	21
1.3.3. Síntesi de NO a partir de l'oxidació de la L-arginina.....	22
1.3.4. Determinació de la concentració de NO.....	22
1.3.4.1. Determinació de NO en temps real.....	22
1.3.4.2. Determinació de productes finals estables de l'oxidació de NO	23
1.3.5. Determinació de l'activitat de NOS.....	24
1.3.6. Inhibidors de la NOS.....	24
1.3.7. Regulació de la NOS.....	25
1.3.8. Distribució tissular de les isoformes de NOS.....	25

1.3.9. Funcions fisiològiques del NO al sistema cardiovascular.	27
1.3.10. Funcions fisiopatològiques del NO al sistema cardiovascular.	30
1.4. CITOQUINES	31
1.4.1. Interleuquina-6.....	31
1.4.1.1. Proteïna:.....	31
1.4.1.2. Gens i transcripció	31
1.4.1.3. Funció biològica	32
1.4.1.4. Patologia:	32
1.4.2. Receptors de la interleuquina-6.....	32
1.4.3. Factor de necrosis tumoral- α	33
1.4.3.1. Línies cel·lulars	33
1.4.3.2. Inducció	33
1.4.3.3. Inhibició	34
1.4.3.4. Efectes biològics:	34
1.4.4. Receptors del factor de necrosis tumoral	34
1.5. MITOCÒNDRIA.....	35
1.5.1. Funcionalisme mitocondrial	35
1.5.1.1. Estructura de la mitocòndria	35
1.5.1.2. Transport mitocondrial	35
1.5.1.3. Cicle de Krebs.....	37
1.5.1.4. Cadena respiratòria mitocondrial	38
1.5.1.4.1. Components de la cadena respiratòria mitocondrial:	38
1.5.1.4.2. Funcionalisme de la cadena respiratòria mitocondrial.....	39
1.5.1.5. Fosforilació oxidativa.....	40
1.5.2. Defectes primaris de la cadena respiratòria mitocondrial	41
1.5.2.1. Deficiències del complexe I.....	43
1.5.2.2. Deficiències del complexe II.....	44
1.5.2.3. Deficiències del complexe III.....	44
1.5.2.4. Deficiències del complexe IV	44
1.5.2.5. Deficiències del complexe V.	46
1.5.3. Malalties cardíques associades a defectes de la cadena respiratòria mitocondrial.	46
1.5.3.1. Miocardiopatia dilatada i alteracions mitocondrials.....	46
2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	48

3. DISCUSSIÓ	50
3.1. NOS II A LA ICC	51
3.2. CITOQUINES I NOS II A LA ICC	51
3.3. CITOQUINES ACTIVACIÓ NEUROHORMONAL I ICC. VALOR PRONÒSTIC.....	52
3.4. NO I CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL	54
3.5. DISCUSSIÓ CONJUNTA.....	55
4. CONCLUSIONS.....	58
5. BIBLIOGRAFIA	61
6. ARTICLES PUBLICATS.....	80

TAULES

Taula I. Interaccions bioquímiques del NO i espècies redox relacionades.....	16
Taula II. Bioregulació de proteïnes mediades per NO.....	17
Taula III. Nomenclatures de NOS.....	18
Taula IV. Pes molecular, polipèptids i grups prostètics dels diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial	39
Taula V. Espectre de síndromes clíniques associades a una deficiència primària de l'activitat dels complexos de la CRM.....	42
Taula VI. Malalties mitocondrials que inclouen una deficiència del complex IV aïllada o en associació amb deficiències a l'activitat d'altres complexos de la CRM.	45

FIGURES

Figura 1. A miocardiopatia dilatada primària amb la fibrosi intersticial característica. B miocarditis aguda amb infiltració inflamatòria del miocardi.	5
Figura 2. Diagrama de Lewis de l'estructura del NO.....	15
Figura 3. Model d'engranatge de NOS II de formació d'un dímer actiu (Stuehr, 1997).	20
Figura 4. Relaxació vascular mediada per Òxid Nítric.	29
Figura 5. Estructura esquemàtica de la IL-6.	31
Figura 6. Tipus de transport mitocondrial.....	37
Figura 7. Funcionalisme de la cadena respiratòria mitocondrial.	40

ABREVIATURES

A431,KB	Cèl·lules epidèrmiques.
ANP	Factor natriurètic auricular.
BH4	Tetrahidrobiopterina.
BNP	Factor natriurètic cerebral.
C II	Complexe II.
C III	Complexe III.
C IV	Complexe IV.
CaM	Calmodulina.
CESS	Línia cel·lular β transportada pel virus EB.
COX	Ciclooxygenasa.
CRM	Cadena respiratòria mitocondrial.
CV	Complexe V.
DNAmt	DNA mitocondrial.
EDRF	Factor de relaxació derivat de l'endoteli.
FAD	Flanina adenina dinucleòtid.
FMN	Flanina mononucleòtid.
GMPc	Guanilat ciclasa.
Gp130	Glicoproteïna 130.
Hemo	Grup ferro-protoporfirina IX.
Hep62, Hep3B	Línia cel·lular de l'hepatoma.
HLA	Antígen leucocitari humà.
ICC	Insuficiència cardíaca.
IECA	Inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina.
IFN- γ	Interferó - γ
Ig 6	Immunoglobulina 6.
IL – 2	Interlenquina – 2.
IL – 6	Interlenquina – 6.
IL-1 β	Interlenquina - 1 β
IL-4	Interlenquina – 4
IL-6	Receptor de la IL-6.
KT-3	Línia cel·lular T.
L-NAME	N ⁶ – nitro – L – anginina metil ester
L-NIL	L-N6 (1-iminoetil) – lisina
L-NMA	L ⁶ – monometil-L-arginina.

L-NNA	N ⁶ -nitro-L-arginina.
LPS	Lipopolisacàrid bacterià.
MCD	Miocardiopatia dilatada.
MCDI	Miocardiopatia dilatada idiopàtica.
MCH	Miocardiopatia hipertròfica.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat.
NO ⁻	Anió nitrocil
NO	Òxid nítric.
NO ₂	Diòxid de nitrogen
NOS I	NO sintetasa neuronal.
NOS II	NO sintetasa induïble.
NOS III	NO sintetasa constitutiva.
Nox	Nitrats – nítrits.
NYHA	New York Heart Association.
ONOO-	NO i/o peroxinitrits
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa.
RNA m	RNA missatger.
sIL – 2R	Receptor soluble de la interlenquina – 2.
TNF - α	Factor de necrosis tumoral - α .
U266	Línia cel·lular del mieloma.
U937	Línia cel·lular de l'histiocitoma.
VE	Ventricle esquerre.

ARTICLES QUE COMPONEN AQUESTA TESI

Aquesta tesi es basa en els següents articles referenciats al text amb els seus corresponents números romans:

Article I: Josefina Orús, Magda Heras, Manuel Morales-Ruiz, Alberto Leivas, Eulàlia Roig, Montserrat Rigol, Francisca Rivera, Ginés Sanz, Wladimiro Jiménez. Nitric Oxide Synthase II mRNA Expression in cardiac tissue of patients with heart failure undergoing cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:139-144.

Article II: Eulàlia Roig, Josefina Orús, Carles Paré, Manel Azqueta, Xavier Filella, Fèlix Pérez-Villa, Magda Heras, Ginés Sanz. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Journal Cardiol* 1998; 82:688-690.

Article III: Josefina Orús, Eulàlia Roig, Fèlix Pérez-Villa, Carles Paré, Manel Azqueta, Xavier Filella, Magda Heras, Ginés Sanz. Prognostic value of serum cytokines in patients with congestive heart failure. *J Heart Lung Trasplant* 2000;19:419-425.

Article IV: Diana Jarreta, Josefina Orús, Antoni Barrientos, Oscar Miró, Eulàlia Roig, Magda Heras, Carlos T Moraes, Francesc Cardellarch, Jordi Casademont. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 2000;45:860-865.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ANTECEDENTS

La miocardiopatia dilatada (MCD) és una malaltia greu, que es manifesta sovint en fases molt avançades en forma d'insuficiència cardíaca congestiva terminal. El tractament és només simptomàtic i a la fase final el trasplantament cardíac és l'única solució per disminuir-ne la morbiditat i mortalitat. Diversos factors han estat identificats com a causals de la MCD tals com l'alcohol, la cocaïna, infeccions virals, herència, etc. Quan no se'n coneix la causa el diagnòstic és de MCD idiopàtica (MCDI), afectant a un grup important de pacients sense antecedents coneguts que justifiquin la disfunció ventricular. Independentment dels factors etiològics, els mecanismes finals que provoquen l'alteració miocàrdica són desconeguts, així com el paper que puguin jugar inicialment o de manera constant respostes inflamatòries o immunològiques que han estat descrites en alguns pacients (Dec i col,1994/ James i col,1993/Keren i col,1990/Diaz i col,1987).

1.1.1. Inflamació i citoquines

Limas i cols. han demostrat que l'activació dels limfòcits T, mesurada com els canvis de receptors solubles de la interleuquina-2 (sIL-2R) en sèrum estaven freqüentment elevats en pacients amb MCDI, però només en el 6% dels pacients amb cardiopatia isquèmica. El grup de pacients amb sIL-2R elevat es caracteritzava per ser d'edat més avançada, amb una proporció de dones superior i una afectació ventricular més severa (Limas i col, 1995).

També Katz i cols han comprovat que una altra citoquina, TNF- α estava elevada de forma significativa en pacients amb insuficiència cardíaca i a la vegada estava involucrada en la regulació del metabolisme de l'òxid nítric (Katz i col, 1994). Levine i cols. van mostrar que els nivells de TNF- α sistèmics estaven augmentats en pacients caquètics amb insuficiència cardíaca crònica i que aquesta elevació estava associada a una marcada activació del sistema renina-angiotensina (Levine i col, 1990).

1.1.2. Òxid nítric

L'òxid nítric (NO) és una molècula que intervé en la regulació de múltiples

sistemes, entre ells el circulatori. El NO es sintetitza a partir de la L-Arginina per tres enzims: la NO sintetasa constitutiva (NOS III), la NO sintetasa induïble (NOS II), que és Ca^{2+} independent i que s'expressa a certs òrgans després de l'estimulació per endotoxines o algunes citoquines (Moncada i col, 1991) i la NO sintetasa neuronal (NOS I).

Estudis en rates han demostrat que els miòcits cardíacs poden expressar NOS II després del tractament amb citoquines. En un model de múscul papil·lar aïllat d'hàmsster, Finkel va demostrar que l'efecte inotrop negatiu observat quan s'afegia al bany "tumor necrosis factor" (TNF- α), interleuquina-2 (IL-2) o interleuquina-6 (IL-6) era degut a l'alliberament de NO després de l'activació de la sintetasa miocàrdica, ja que es podia inhibir mitjançant l'addició de NG-monometil-L-Arginina (L-NMA)(Finkel i col,1992). Balligand i col (1994) van demostrar l'expressió de la NOS II en cultius de miòcits ventriculars de rata adulta pre-tractats amb citoquines, però no en presència de D-Arginina. La contractilitat cel·lular augmentava en presència de D-Arginina. La contractilitat cel·lular, després de ser estimulada amb isoproterenol es reduïa en presència de L-Arginina i citoquines. Aquests resultats indiquen que l'alteració de la contractilitat després de l'exposició dels miòcits a citoquines inflammatòries es produeix per la inducció de NOS II miocàrdic (Balligand, 1994).

Hi ha escassos estudis realitzats en pacients. De Belder i cols. van mesurar l'activitat de la NOS III i de la NOS II en pacients amb MCDI i van observar un augment significatiu de l'activitat de l'enzim induïble, acompanyat d'una activitat reduïda de la NOS III (De Belder, 1993). Habib i cols. van estudiar la inhibició de la producció de l'òxid nítric en pacients amb insuficiència cardíaca congestiva mitjançant l'administració de L-NMA. El seu estudi va demostrar que aquells pacients amb les resistències vasculars sistèmiques més altes tenien paradoxalment una major producció de NO, ja que van respondre a l'administració de L-NMA amb un augment de les resistències superior a l'experimentat per altres pacients (Habib i col, 1994). Winlaw va demostrar un augment de la producció de nitrats, mesurats amb cromatografia de gasos, en pacients amb insuficiència cardíaca congestiva, secundària a MCDI i cardiopatia isquèmica, en comparació amb 62 controls sans. Va concloure que la vasodilatació causada per l'òxid nítric podria compensar la vasoconstricció secundària als canvis neurohumorals de la insuficiència cardíaca, sense descartar un possible efecte negatiu directe sobre la contractilitat cardíaca

(Winlaw i col, 1994).

El significat de l'expressió de la NOS II al miocardi humà està encara per determinar. De tota manera, al miocardi de rata, la inducció d'aquest enzim produeix un augment del NO i de cGMP que és tòxic pel miòcit.

En resum, la revisió de la literatura més recent mostra que a la MCDI l'alteració de la immunitat cel·lular juga un paper clar i que aquesta es manifesta a través de mediadors com són les citoquines, les quals a la vegada poden actuar regulant l'expressió d'altres enzims, com són els isoenzims de la sintetasa de l'òxid nítric. Cal destacar que la majoria d'aquestes dades han estat obtingudes en animals d'experimentació o en cultius cel·lulars. Per tant, la seva confirmació en pacients és en aquests moments de gran interès.

1.2. MIOCARDIOPATIES DILATADES

Les miocardiopaties dilatades (MCD) constitueixen un grup de cardiopaties que es caracteritzen per una funció muscular anormal, que comporta una disfunció predominantment sistòlica i diastòlica d'ambdós ventricles, en general en paral·lel. Segons l'etiologia hi ha diferents tipus de miocardiopaties: la miocardiopatia dilatada idiopàtica (MCDI), la miocardiopatia hipertròfica, la cardiopatia isquèmica, la cardiopatia valvular, la cardiopatia hipertensiva i la miocardiopatia restrictiva com a formes més prevalents.

MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÀTICA:

Es tracta d'una malaltia primària del miocardi de causa desconeguda caracteritzada per dilatació del ventricle esquerre (VE) o biventricular i una alteració de la contractilitat miocàrdica (Report of the Who, 1980).

La incidència anual als Estats Units és de 5-8 nous casos per 100.000 habitants i la prevalença ajustada per l'edat és de 36 casos per 100.000 habitants i resulta en 10.000 morts anuals (Gillum i col, 1986) (Codd i col, 1989).

1.2.1. Anatomia patològica

A nivell macroscòpic, sèries autòpsiques han mostrat dilatació biauricular i biventricular, excedint normalment la dilatació ventricular a la de les aurícules (Silver

i col, 1988/ Roberts i col, 1987). Es poden trobar cicatrius murals de tamany variat i els trombus intraventriculars constitueixen una troballa freqüent a les sèries autòpsiques. Les troballes histològiques de la MCDI no són massa específiques, sol trobar-se hipertròfia miocitària, nuclis grans i irregulars, pèrdua miofibril·lar i mitocòndries petites, allargades i pleomòrfiques (Figura 1, A i B). Aquests canvis morfomètrics de la MCDI són independents de l'estadi clínic de la malaltia.

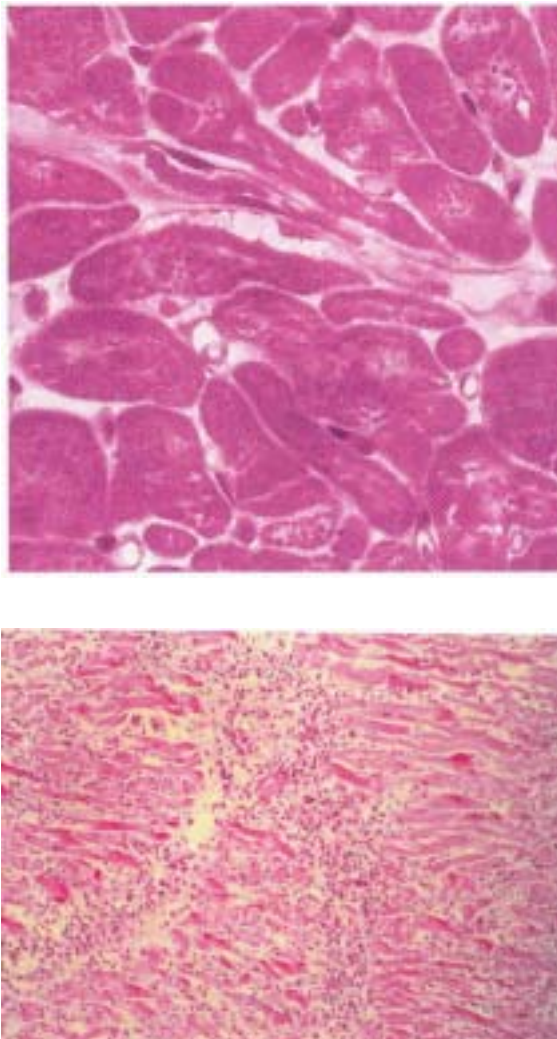


Figura 1. **A** miocardiopatia dilatada primària amb la fibrosi intersticial característica. **B** miocarditis aguda amb infiltració inflamatòria del miocardi.

A nivell subcel·lular, la microscopia electrònica ha demostrat alteracions patològiques significatives de l'arquitectura cel·lular. En un 40% de les cèl·lules les proteïnes contràctils miosina, actina, troponina i troponina T falten o estan alterades.

A nivell molecular existeix una reducció significativa de la massa de les proteïnes miofibril·lars en pacients amb insuficiència cardíaca terminal. Hi ha una reducció de l'expressió del RNA missatger (RNAm) de la cadena pesada de la miosina β i de l'actina. També s'han observat canvis a l'expressió genètica de les proteïnes del reticle sarcoplasmàtic (Hein i col, 1992 /Schaper i col, 1991). El citosquelet de la cèl·lula muscular cardíaca està també significativament alterat als cors de pacients amb MCDI, ja que la proteïna del citosquelet connectina que assegura la continuïtat estructural de les fibres musculars relaxades i probablement juga un important paper per determinar la conducta elàstica del sarcòmer, es troba reduïda i desorganitzada en els miòcits dels pacients amb MCDI (Hein i col, 1994).

1.2.2. Etiologia

Diversos processos sistèmics, entre els quals hi ha processos inflamatoris, infiltratius, infecciosos, immunològics, metabòlics, del col·lagen, vasculars, tòxics, neoplàssics i familiars/genètics s'han implicat com a possibles etiologies de la MCD. Quan la causa és desconeguda aleshores el diagnòstic és de MCDI.

La MCD secundària a patologies conegudes dona quadres clínics i morfològics similars a la MCDI, de manera que tant la idiopàtica com la secundària representen una mateixa malaltia com a conseqüència de l'alteració i remodelat miocàrdic secundari als processos sistèmics prèviament mencionats.

1.2.2.1. Miocarditis viral i MCD

S'ha suggerit que la MCD és una seqüela tardana de la miocarditis cardiotròpica aguda en certes poblacions de pacients. La miocarditis humana és un fenomen ben establert secundari a les infeccions virals produïdes per coxsackie B o ecovirus (Reyes i col,1985). A la miocarditis aguda s'ha observat un increment de quatre vegades dels anticossos neutralitzants al virus coxsackie B, però la resposta persistent dels anticossos a títols elevats en els estadis latents és infreqüent. Aquestes troballes concorden amb una reducció del títol de virus viu en progressar la malaltia, i per tant són anàlogues a les que s'observen als models murins de miocarditis enteroviral. Recentment, les tècniques de biologia molecular (Northern blot, Southern blot i reacció de polímers en cadena) han estat útils per diferenciar

diversos grups de pacients amb miocarditis deguda a virus d'evolució. Depenent de l'experiència de l'investigador s'ha detectat el genoma de l'enterovirus entre el 5% i un 50% de les biòpsies procedents de pacients amb miocarditis crònica, miocarditis activa o MCD (Martino i col, 1994/Archard i col, 1991/ Schawaiger i col, 1993). Els pacients que requereixen trasplantament cardíac com a conseqüència de MCD tenen una incidència significativament més alta de RNA viral al seu miocardi que els controls (Bowles i col, 1989).

1.2.2.2. Mecanismes immunològics

S'han trobat alteracions a la immunitat cel·lular i humoral tant a la miocarditis com a la MCDI; de tota manera es desconeix si aquestes alteracions són una causa o una conseqüència d'aquestes malalties o si tenen un paper patogènic específic. En teixits procedents de biòpsia miocàrdica de pacients amb miocardiopatia dilatada s'han trobat anticossos fonamentalment del tipus de les immunoglobulines G (Ig G). S'han descrit autoanticossos contra diversos antígens tissulars miocàrdics entre els que es troben estructures de membrana (miolemma, sarcolemma i receptor β adrenèrgic) (Herzum i col,1989/Maisch i col,1986/Obermayer i col,1987) i proteïnes intracel·lulars (miosina i antígens mitocondrials) (Caforio i col,1992/Klein i col,1984/Schulteiss i col,1983/Shulze i col,1990). També s'han identificat anticossos contra cèl·lules endotelials en pacients amb MCD (Maisch i col,1991). Per exemple, els anticossos antinuclears i antifibril·lars s'han relacionat amb la insuficiència cardíaca (Maisch i col,1983).

També en els darrers anys hi ha un interès creixent en estudiar el polimorfisme de l'antigen leucocitari humà (HLA) com a factor de risc independent pel desenvolupament de MCD. Les molècules de HLA a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (com les cèl·lules de l'endoteli vascular i les cèl·lules intersticials del miocardi) formen complexos amb antígens propis o antígens propis alterats, anàlegs a un complex amb antigen extrany-HLA, que condueix a una reacció autoimmune (Kuhl i col,1994). Dades preliminars mostren algunes de les associacions positives i negatives de la HLA amb la MCD. Per exemple, hi ha un augment de l'expressió dels antígens HLA-B27, HLA-A2, HLA-DR4, HLA-DQ4 i HLA-DQ8 en pacients amb MCD, mentre que la freqüència de l'expressió del HLA-DRW6 està significativament reduïda en aquests pacients (Anderson i col,1984/Li i

col,1993). En teoria, aquestes anomalies immunogenètiques en certs subgrups de MCD podrien donar lloc a una resposta immunitària alterada, responsable de l'etapa postvirèmica de la MCD. Per tant, les hipòtesis viral i autoimmune de la patogènia de la miocarditis i de la MCD no són mútuament excloents.

1.2.2.3. Factors familiars, genètics i moleculars

Les **miocardiopaties familiars** es divideixen en dos amplies categories: (1) aberrància en la síntesi de proteïnes contràctils i estructurals i (2) malalties del metabolisme energètic cardíac, entre les que es troben les anomalies de l'oxidació dels àcids grassos i de la fosforilació oxidativa. Els defectes de les proteïnes contràctils i estructurals inclouen la miocardiopatia hipertròfica familiar i les distròfies musculars lligades al cromosoma X amb o sense MCD. Els errors congènits de l'oxidació dels àcids grassos i de la fosforilació oxidativa es manifesten freqüentment com a miocardiopatia hipertròfica (MCH), encara que tenen una forma dilatada amb severitat variable (Kelly i col,1994).

L'anàlisi de nombroses famílies amb MCD ha demostrat que al voltant del 20% de totes les miocardiopaties dilatades poden ser de tipus familiar (Dansky i col,1994/ Michels i col,1992). Dos terços dels familiars afectats dels pacients amb MCD estan asimptomàtics àdhuc en presència d'evidència ecocardiogràfica de la malaltia. S'ha observat que la forma autossòmica dominant és la forma més freqüent d'herència, encara que hi ha unes poques famílies amb una herència autossòmica recessiva i en d'altres unida al cromosoma X (Morian i col,1994/Berko i col,1987/Michels i col,1992). El defecte genètic de la miocardiopatia dilatada pot estar limitat al teixit miocàrdic o pot implicar a múltiples òrgans com s'observa a la distròfia miotònica, manifestant-se com una malaltia sistèmica.

La **miocardiopatia lligada al cromosoma X** és una forma infreqüent de MCD que es manifesta en homes joves com una insuficiència cardíaca primària ràpidament progressiva. En les dones portadores és una malaltia lentament progressiva d'inici tardà. Dades recents suggereixen que el pacient amb MCD lligada al cromosoma X presenten un defecte al gen de la distrofina localitzat al braç curt del cromosoma 21 (Xp21). Aquest defecte genètic dona lloc a l'expressió reduïda de la distrofina miocàrdica sense afectar l'expressió de la del múscul

esquelètic.

La **distròfia miotònica** és un altre tipus de miocardiopatia hereditària que afecta al miocardi i al teixit de conducció. La malaltia es transmet com un tret autosòmic dominant i els pacients presenten defectes de conducció i insuficiència cardíaca. L'anàlisi genètica ha trobat que la malaltia està relacionada amb el gen de la proteinquinasa de la mionina al braç curt del cromosoma 19 (19q13). Una expansió en el nombre de trinucleòtids GCD repetits a les regions 3' del gen de la mionina proteinquinasa és responsable de la distròfia miotònica

Miocardiopatia mitocondrial. A part de les mutacions en el DNA del nucli descrites, s'han implicat a les miopaties familiars mutacions al DNA mitocondrial. Les mitocondries, petites organel·les intracitoplasmàtiques que constitueixen el lloc primari del metabolisme aeròbic (cicle de Krebs i fosforilació oxidativa), tenen també quantitats significatives de DNA genòmic. Se sap des de fa temps que les mutacions del DNA mitocondrial estan implicades a la transmissió d'algunes malalties com les encefalopaties i miopaties (Carter i col,1994). Aquestes mutacions s'han estudiat també tant a la MCD com a la miocardiopatia hipertròfica i s'ha trobat que inclou tant mutacions puntuals com delecions amples del DNA. Com que totes les mitocondries de la descendència d'ambdós sexes s'hereten de l'òocit matern, la transmissió de la miocardiopatia mitocondrial com les miocardiopaties unides al cromosoma X, és fa a través de la mare. De tota manera, la presentació fenotípica de la malaltia a la MCD mitocondrial és complexa degut a que una cèl·lula consta de nombroses còpies de DNA mitocondrial. El quocient de genoma mitocondrial mutant en relació al normal varia de teixit a teixit i de persona a persona. Posteriorment a l'apartat 1.5 de la introducció s'aprofundeix a les miocardiopaties mitocondrials.

1.2.2.4. Mecanismes neurohormonals

Independentment de la causa de la MCD, els mecanismes fisiopatològics de la malaltia són comuns. La MCD està marcada per una reducció de la funció contràctil que de forma concomitant redueix el volum minut i el cabal cardíac. Quan el cabal cardíac es veu significativament reduït, s'activen múltiples mecanismes neurohormonals incloent el sistema nerviós simpàtic, el sistema renina-angiotensina, el sistema de la vasopressina i prostaglandines i la producció de factor natriurètic

auricular (FNA) (Packer i col,1987). El resultat d'aquesta tempesta neurohormonal és un augment de la freqüència cardíaca, una reducció de la contractilitat i un augment de la resistència perifèrica total.

Sistema nerviós simpàtic

L'activació del sistema nerviós simpàtic en els pacients amb insuficiència cardíaca (ICC) representa el mecanisme compensador més important induït com a resultat d'una reducció del cabal cardíac. Els nivells de noradrenalina plasmàtics estan marcadament elevats i es correlacionen amb la severitat de la ICC (Parmley i col,1990/Benedict i col,1994). No queda clar que és el que desencadena la resposta simpàtica. Resultats dels estudis de Disfunció Ventricular Esquerra (SOLVD) suggereixen que l'activació simpàtica precedeix a l'aparició de signes i símptomes de ICC i de fet pot precedir a l'activació de l'eix renina-angiotensina (Benedict i col,1994).

1.2.2.4.1. Sistema renina-angiotensina

El paper del sistema renina-angiotensina a la patogènia de la ICC ha estat objecte de diversos estudis. La seqüència d'activació del sistema renina-angiotensina va ser estudiat primer per Watkins i col (1976) en un model experimental. La reducció del cabal cardíac dóna lloc a la síntesi de renina amb un augment posterior dels nivells d'angiotensina II i aldosterona en plasma, que resulta en vasoconstricció i retenció de líquid. Quan aquest mecanisme compensador corregeix el cabal cardíac fins a valors normals, l'eix renina-angiotensina torna a la situació basal (Benedict i col,1994). Alguns estudis suggereixen l'existència de sistemes miocàrdics tissulars renina-angiotensina. S'ha demostrat la presència de receptors funcionants d'angiotensina II en cors d'individus normals i de pacients amb ICC (Urata i col,1989). Diversos estudis indiquen que l'angiotensina II miocàrdica està implicada en el remodelat ventricular secundari a la dilatació cardíaca en pacients amb ICC (Nattilan i col,1989). El tractament de pacients amb ICC amb inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina (IECA) ha mostrat una reducció significativa dels volums telesistòlic i telediastòlic en relació als pacients tractats amb placebo (Konstam i col,1992). Encara que la reducció de l'estrès parietal del ventricle esquerre resultant de la reducció de la post-càrrega podria haver contribuït a aquest procés, no es poden excloure els efectes tissulars locals de l'angiotensina II.

1.2.2.4.2. Vasopressina

Els nivells de vasopressina plasmàtica, de forma similar a la noradrenalina plasmàtica i la renina estan també elevats en proporció a la severitat clínica de la ICC (Yamane i col,1968). En alguns estudis s'ha implicat a la vasopressina entre els mecanismes vasoconstrictors necessaris per la milloria hemodinàmica (Nicod i col,1985). Els nivells elevats de vasopressina són responsables de la hiponatrèmia, marcador de mala perfusió i mal pronòstic a llarg termini en pacients amb miocardiopatia congestiva.

1.2.2.4.3. Factors natriurètics

Es coneixen tres pèptids natriurètics. El ANP (pèptid natriurètic auricular) que s'allibera al miocardi auricular, com a resposta a l'augment de la pressió d'ompliment. El BNP (pèptid natriurètic cerebral) que es troba al cervell, encara que el seu lloc principal de síntesi és el miocardi ventricular i s'allibera com a resposta a l'augment de l'estrés de la paret i a la pressió d'ompliment. El CNP que es sintetitza a l'endoteli vascular. Els pèptids natriurètics produeixen un efecte vasodilatador, una disminució de la resistència perifèrica i en conseqüència una disminució de la pressió arterial. Tenen un efecte diürètic i natriurètic i suprimeixen el sistema renina-angiotensina, el sistema nerviós simpàtic i l'endotelina.

El BNP seria el marcador idoni per al ICC perquè es sintetitza de forma intermitent i no es diposita en grànuls, ha demostrat en diferents estudis tenir una sensibilitat i especificitat superior que la resta de pèptids i té a més a més una vida mitjana suficientment curta (20 min) que li permet reflectir de forma instantània els canvis que es produeixen a l'hemodinàmica del pacient.

Les aplicacions clíniques de la determinació del BNP són sobretot conèixer l'origen de la dispnea a urgències, però també té un valor pronòstic a la ICC aguda i també pot ser d'utilitat en el despistatge de cardiopatia o en la disfunció diastòlica (Maisel i col, 2002).

1.2.2.5. Paper de les citoquines

Es pensa que la MCDI podria iniciar-se com una inflamació cardíaca

subclínica, no diagnosticada, que alliberaria citoquines i factors de creixement i que afectaria no només als miòcits, sinó que tindria un paper important en la regulació secundària de la hipertròfia dels miòcits i la fibrosi intersticial, que és el patró característic de la MCDI (Herskowitz i col,1993/Roberts i col,1987/Ferrans i col,1989).

Les citoquines són proteïnes de baix pes molecular, produïdes per una gran varietat de cèl·lules (macròfags, limfòcits, etc.) que poden comportar-se com a hormones, tenint un efecte tant a nivell local com sistèmic. La seva interacció amb les cèl·lules diana és a nivell de receptors específics. Actuen com elements integrants d'una xarxa o sistema funcional amb interconnexions en cascada i circuits de retroalimentació positius i negatius (Backwill i col,1989/ Gillis i col,1989).

Tsujino i cols. (1994) també van demostrar que en cultius de cardiòcits de rata, l'administració de IL-1 β induïa l'expressió del RNAm per la NOS II però no per la NOS III; la inducció s'inicia a les 6 hores i arriba a un màxim a les 48 hores. Aquest estudi també va demostrar per immunohistoquímica que el RNAm de la NOS II induït per la IL-1 β i la immunoreactivitat "Inos-like" estaven exclusivament localitzades en els miòcits cardíacs encara que s'expressaven en una petita proporció als no-miòcits (Tsujino i col,1994).

També, Katz i col. han comprovat que una altra citoquina, TNF- α estava elevada de forma significativa en pacients amb insuficiència cardíaca i a la vegada estava involucrada en la regulació del metabolisme de l'òxid nítric (Katz i col,1994). Levine i col. (1990) van comprovar que els nivells de TNF- α sistèmics estaven augmentats en pacients caquètics amb insuficiència cardíaca crònica i que aquesta elevació estava associada a una marcada elevació del sistema renina-angiotensina.

El paper de certes citoquines en la patogènia de la MCD ha intrigat a molts investigadors. S'ha demostrat que l'augment de la concentració tant de interleuquina-6 (IL-6) com de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) s'associa amb insuficiència cardíaca avançada. L'acció proinflamatòria d'aquestes citoquines pot fer una contribució significativa a la patogènia de la insuficiència cardíaca descompensada. El TNF- α produeix un efecte inotròpic negatiu reversible i experimentalment pot produir ICC amb edema pulmonar. El TNF- α és també capaç de produir una

miocardiopatia que es caracteritza per remodelat i dilatació ventricular (Levine i col,1990). És més, s'ha demostrat que el cor miocardiopàtic genera TNF- α (Matsuri i col,1994). Posteriorment a l'apartat 1.4 de la introducció es comentaran les citoquines estudiades de forma individual.

1.2.2.6. Endotelina

Existeix una altra família de pèptids vasoconstrictors produïts per la cèl·lula endotelial, anomenats endotelines i que estan augmentades en la circulació de pacients amb MCD (Hiroe i col,1991). S'han descrit al menys tres isoformes d'endotelina. Les isoformes madures s'obtenen a partir de les "grans endotelines" precursors, per mitjà de l'acció d'un enzim conversor de l'endotelina (Packer i col,1993). Els pacients amb ICC tenen nivells plasmàtics marcadament elevats de la "Big endothelin", independentment de l'existència d'una història d'hipertensió o cardiopatia isquèmica prèvies. Els nivells plasmàtics d'aquesta isoforma de l'endotelina guarden una relació estreta amb la situació clínica o el grau funcional de la NYHA dels pacients, així com amb variables hemodinàmiques com la fracció d'ejecció del VE, la pressió de l'aurícula dreta i la pressió d'enclavament capil·lar pulmonar (Wei i col,1994). És més, s'ha observat una supervivència curta en els pacients amb ICC que tenen els nivells de "Big endothelin" més elevats (Packer i col,1993). El significat fisiopatològic d'un augment de l'endotelina I al plasma de pacients amb ICC no està molt clar. Els canvis a les concentracions plasmàtiques d'endotelina I en pacients amb ICC i com a resposta a canvis posturals són paral·lels a l'augment de noradrenalina plasmàtica i a altres mediadors coneguts de la resposta neurohormonal (Stewart i col,1992). En un model experimental de ICC, s'ha demostrat que l'endotelina augmenta els nivells plasmàtics de pèptid natriurètic auricular, vasopressina i aldosterona (Cavero i col,1990). Considerades en conjunt, aquestes observacions amb altres papers paracrins de l'endotelina I, com l'acció inotròpica positiva sobre el miocardi, l'acció hipertròfica sobre els miòcits i l'activitat antinatriurètica al ronyó (Ito i col,1991/Miller i col,1989/ Moraves i col,1989), suggereixen un paper compensador com a resposta a l'estrès hemodinàmic relacionat amb la severitat de la disfunció del VE.

1.2.2.7. Factor de relaxació derivat de l'endoteli

Les cèl·lules endotelials sintetitzen a més de les endotelines, diferents substàncies que en situació basal, i com a resposta a certs estímuls físics com l'augment de velocitat de cizallament, produeixen relaxació local del múscul llis donant vasodilatació. Aquestes substàncies s'anomenen col·lectivament factor de relaxació derivat de l'endoteli (EDRF)(Luscher i col,1986/ Fostermann i col,1981/ Luscher i col,1987/ Greenberg i col, 1987). Una de les substàncies EDRF més àmpliament estudiades és l'òxid nítric. La vasodilatació dependent de l'endoteli induïda per l'acetilcolina o metilcolina està marcadament reduïda en pacients amb ICC, mentre que la vasodilatació independent de l'endoteli, induïda per nitroprussiat està intacta (Benedict i col,1994/Kubo i col,1991). El mecanisme d'aquesta depressió de la vasodilatació induïda per l'endoteli en pacients amb ICC no està clar; encara que, aquesta vasodilatació local accentuada desvia l'equilibri més cap a la vasoconstricció perifèrica mediada pels mecanismes neurohormonals. Més encara, les diferències regionals de la vasodilatació dependent de l'endoteli poden ser responsables en part, de la diferència en la distribució del cabal cardíac en repòs i durant l'exercici (Zelis i col,1968/ Kubo i col,1991). En conjunt, aquests resultats suggereixen que a l'ajustar de forma individual el tractament vasodilatador per tal de reduir la postcàrrega en aquests pacients, s'han de tenir en compte, a part de les neurohormones circulatòries, els mecanismes locals de regulació vasomotora.

El terme idiopàtic és cada vegada menys aplicable a les miocardiopaties dilatades. La biologia molecular i la investigació clínica han fet progressos significatius. Per desgràcia, els avenços significatius en la comprensió de la causa i els mecanismes de la malaltia a la MCDI no s'han vist complementats per millores significatives en els medis terapèutics. Excepte rares excepcions, només tractem de forma indirecta la MCD controlant la síndrome de la ICC. S'ha de tenir present que la MCDI continua tenint una morbi-mortalitat inacceptablement elevada i per tant segueix sent un repte pels investigadors.

1.3. ÒXID NÍTRIC

1.3.1. Bioquímica del NO

L'òxid nítric (NO) és un gas incolor, amb una solubilitat similar a l'oxigen en mitjà aquós i que actua com a missatger biològic en solucions fisiològiques. Una de les característiques químiques principals del NO és la de presentar una valència lliure a la seva estructura molecular (un electró desaparellat) (Fig.2). Per aquest motiu el NO és capaç de participar en reaccions de transferència d'electrons amb determinades molècules, especialment aquelles que presenten un electró desaparellat (per exemple, radicals lliures).

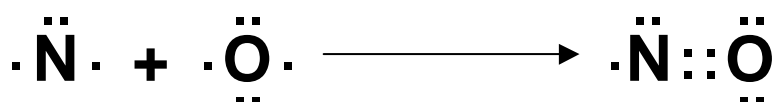


Figura 2. Diagrama de Lewis de l'estructura del NO.

El NO té la capacitat termodinàmica de dur a terme oxidacions de determinades molècules. L'espècie redox resultant, l'anió nitrosilo (NO⁻)(que pot actuar com agent reductor) pot reaccionar amb grups tiols en una reacció que produeix S-nitrosotioles i genera NO i/o peroxinitrits (ONOO⁻). En canvi, la reducció d'un compost mediada per NO només es produeix en el cas de que el compost que reaccioni amb el NO sigui un oxidant fort. L'oxidació del NO dona lloc, per tant, a la formació de l'espècie radical NO⁺, la qual pot nitrosilar grups amino, grups sulfidriils o inclús anells aromàtics. En realitat, entre els agents oxidants candidats a reaccionar amb NO⁺ es troben els següents radicals: diòxid de nitrogen (NO₂), els grups hidroxils o bé l'agent ONOO⁻; l'efecte net d'aquestes reaccions és la formació d'estructures de tipus radical-radical. Aquests compostos formats amb NO juntament amb els seus productes de reaccions secundàries i els productes d'oxidació i reducció del NO són capaces de reaccionar amb metalls de transició, grups tiols i substractes addicionals, donant lloc a una gamma ampla de productes que

presenten una activitat biològica rellevant, taules 1-2 (Stamler i col,1992).

Taula I. Interaccions bioquímiques del NO i espècies redox relacionades.

Espècies redox Derivades del NO	Reactius	Productes finals
NO	Metalls de transició Oxigen (O ₂) Superòxid	Hemoglobina(Fe ²⁺)-NO Nitrits (NO ₂) Peroxinitrits (ONOO ⁻)
NO ⁺	Amines Tiols Anells aromàtics	Nitrosamines Proteïna(Cis)S-NO Ar-NO
NO ⁻	Dimerització Tiols Metalls	N ₂ O R-S-OH,RS-SR Hemoglobina(Fe ³⁺)-NO
ONOOH,ONOO ⁻	DNA Tiols Tirosina	Deaminació de bases R-S-OH,R-S-OOH Proteïna(Tyr)-NO ₂

Taula II. Bioregulació de proteïnes mediades per NO.

	Membranal	Citosòlica	Nuclear	Extracel·lular
Tiols	Receptor NMDA Canal Kca+ Proteïna G Adenilat ciclasa	GAPDH Aldolasa Aldehid deshidrogenasa δ-glutamilcisteïna sintetasa Actina Glutation	AP-1 NF-λB	Glutation Albúmina
Metalls		Guanilat ciclasa Hemoglobina Aconitasa Ciclooxigenases Citocrom P450 NOS Complexes I i II de la cadena respiratòria	SoxRS	

(Stamler,1994)

1.3.2. Isoformes de NOS.

S'han utilitzat diferents nomenclatures per designar les diferents isoformes de NOS. Entre aquestes s'hauria de destacar la nomenclatura numèrica suggerida l'any 1991 per Förstermann i col, la qual es basa en l'ordre històric de purificació de les isoformes de NOS (Taula III). Altres autors prefereixen tanmateix, descriure aquestes isoformes sobre la base dels tipus cel·lulars o teixits d'on deriven aquests enzims, o bé de la seva expressió constitutiva o induïble. A la taula III es fa un resum de les diferents nomenclatures, així com una breu descripció.

Taula III. Nomenclatures de NOS.

Numèrica	Descriptiva	Definició
NOS I (o NOS 1)	b-NOS (brain NOS) c-NOS (expressió constitutiva de NOS) n-NOS (forma neuronal) nc-NOS (isozima NOS constitutiva, neuronal)	NOS de baix rendiment que s'expressa constitutivament i que la seva activitat es regula per la concentració de Ca ²⁺ intracel·lular.
NOS II (o NOS 2)	i-NOS (forma induïble) mac-NOS (NOS de macròfag) hep-NOS (NOS d'hepatòcit)	NOS d'alt rendiment. La seva expressió s'indueix per citoquines i la seva activitat és independent de la concentració de Ca ²⁺ intracel·lular.
NOS III (o NOS 3)	e-NOS (NOS endotelial) c-NOS (NOS d'expressió constitutiva) ec-NOS (NOS endotelial, constitutiva)	NOS de baix rendiment que s'expressa constitutivament i que la seva activitat es regula per la concentració de Ca ²⁺ intracel·lular.

Cada isoforma de la NOS presenta els mateixos dominis catalítics. La seva característica principal és que estan constituïdes per un domini reductasa en l'extrem COOH terminal i un domini oxidatiu en l'extrem NH₂ terminal. L'estructura primària del domini reductasa de les isoformes de NOS presenta seqüències consens per la unió de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH), flavina adenina dinucleòtid (FAD) i flavina mononucleòtid (FMN). El domini oxigenasa conté llocs d'unió per a la L-arginina, tetrahidrobiopterina, i un grup ferro-protoporfirina IX (hemo). A més, cada isoenzim presenta una seqüència d'unió a la calmodulina, així com una extensió N-terminal la qual no és essencial per a la catàlisi i té una funció més relacionada amb la localització intracel·lular de l'enzim.

1.3.2.1. Activació enzimàtica de les isoformes de NOS.

Les isoformes NOS I i NOS III s'expressen constitutivament però l'activació enzimàtica requereix l'estimulació de la via Ca²⁺/calmodulina. La síntesi i alliberament de NO per aquestes isoformes constitutives és ràpida i no depèn de la nova síntesi proteica. Per tant, la seva activitat és dependent dels nivells intracel·lulars de Ca²⁺. En canvi, la isoforma NOS II és induïble, és a dir, el gen que codifica per aquesta isoforma no es transcriu en la cèl·lula al menys que aquesta

hagi rebut algun tipus d'estímul mitjançant citoquines i/o lipopolisacàrid bacterià (LPS). Una vegada aquesta isoforma s'ha induït, l'enzim produeix grans quantitats de NO i la seva activitat és independent dels nivells intracel·lulars de Ca^{2+} .

L'activació enzimàtica es realitza mitjançant la formació d'un homodímer que permet l'oxidació, dependent de NADPH, de cinc electrons de la L-arginina generant NO. Els electrons són substituïts per NADPH, transportats a través de les flavines i presentats al grup hemo amb funció catalítica. Les seqüències d'unió per a la flavina i el NADPH es troben localitzades a l'extrem carboxil del NOS, sent aquesta regió estructuralment homòloga amb la de l'enzim citocrom p-450 reductasa.

Un dels models d'activació de NOS es mostra a la figura 3 (Stuehr i col, 1997). La formació d'un enzim actiu de NOS podria tenir lloc en dues modificacions seqüencials post-traduccionals. Primer, la proteïna adquireix un domini reductasa funcional mitjançant la unió de FAD, FMN i en el cas de NOS2 CaM (Cho i col, 1992). Això genera un monòmer que és capaç de catalitzar la transferència d'electrons des de NADPH però és inactiu a l'hora de sintetitzar NO. Els monòmers s'engranen per formar un dímer en una reacció que requereix la presència de grups hemo. La formació de dímers es veu acompanyada per la incorporació de tetrahydrobiopterina (BH_4) en la proteïna (una tetrahydrobiopterina per subunitat) (Griffith i col, 1995/ Marletta i col, 1993). La interacció dimèrica probablement solament abraça els dominis oxidatius de cada subunitat. La formació del dímer de NOS en presència de tetrahydrobiopterina, junt amb L-arginina, altera l'estructura del grup prostètic hemo possibilitant l'activació enzimàtica.

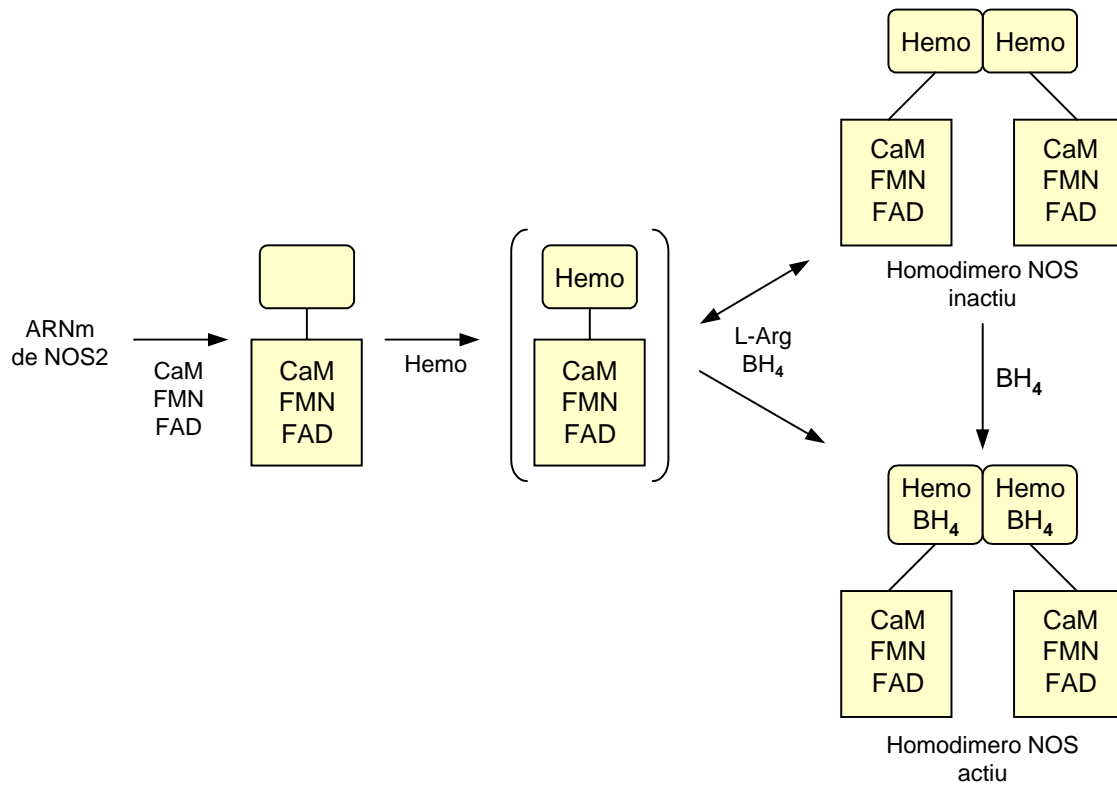


Figura 3. Model d'engranatge de NOS II de formació d'un dímer actiu (Stuehr, 1997).

1.3.2.2. Efecte de la tetrahidrobiopterina a l'activació del NOS.

(6R)-5,6,7,8- tetrahidrobiopterina (BH_4) actua com a cofactor d'un tipus d'enzims que hidroxil·len els aminoàcids aromàtics fenilalanina, tirosina i triptòfan (Nichol i col, 1985). Aquests enzims utilitzen BH_4 com donador d'electrons cooxidant-se amb els aminoàcids substrats i donant lloc a BH_2 . En preparacions cel·lulars aquests productes d'oxidació són reciclats per tornar a donar lloc a BH_4 mitjançant l'enzim dihidrofolat reductasa.

Les tres isoformes de NOS requereixen el cofactor BH_4 per a la seva activitat catalítica (Mayer i col, 1990). L'efecte de BH_4 en la síntesi de NO és altament específic i es realitza a concentracions nanomolars. Estudis realitzats per Giovanelli i col (1991) mostren que la BH_4 més que actuar com un donador d'electrons, actua com un efector alostèric de NOS. Com a recolzament d'aquesta hipòtesi existeixen dades que mostren que la BH_4 és requerida com un estabilitzant de l'estructura dimèrica de NOS II en macròfags (Baek i col, 1993).

Tanmateix, el paper de BH_4 no es confina només al seu efecte sobre la conformació de NOS. A l'any 1994, Griscavage i cols., mentre estudiaven el possible efecte de NO en la inhibició enzimàtica de NOS, suggeriren una nova funció reguladora de la BH_4 . Aquests investigadors trobaren que la BH_4 era molt efectiva en el restabliment de l'activitat de NOS després de la inactivació d'aquest enzim. D'aquesta manera BH_4 pot desenvolupar un efecte de protecció de NOS davant una inhibició mediada pel seu producte enzimàtic.

1.3.2.3. Regulació específica de les diferents isoformes de NOS mitjançant la calmodulina.

La primera NOS purificada va ser la forma constitutiva aïllada a partir del cerebel de rata (Bredt i col, 1991). La pèrdua d'activitat observada durant la purificació portà a la conclusió de que es requeria CaM per a aquesta isoforma. NOS és un enzim estrictament dependent de CaM que l'activa facilitant la transferència d'electrons des del domini reductor fins el domini oxigenasa. La seqüència consens per a la unió de la CaM està localitzada prop del centre de NOS, separant el domini oxigenasa del domini reductasa. A l'any 1993, i basant-se en estudis realitzats sobre flux d'electrons, Abu Soud i col (1993) concloueren que quan no hi ha unió entre Ca^{2+}/CaM i NOS, el domini reductasa no pot subministrar electrons al grup hemo; mentre que quan el complex CaM està unit a l'enzim aquest s'activa, permetent la comunicació electrònica entre aquestes dues subunitats.

Una diferència fonamental entre els isoenzims de NOS és que mentre la unió de CaM a les formes NOS I i NOS III respon a canvis fisiològics en la concentració de Ca^{2+} , NOS II uneix CaM independentment de les concentracions intracel·lulars de Ca^{2+} . Un fet que explicaria aquest fenomen seria l'existència en NOS I i NOS III d'un insert de 40 residus en el domini FMN (residus 594-638 en NOS II humana i 830-870 en NOS I de rata) que no es troba en NOS II. Pèptids sintetitzats in vitro amb la mateixa seqüència competeixen per la unió de CaM, segons experiments realitzats per Salerno i col (1997). Aquest insert que es troba prop del domini de reconeixement de CaM actuaria com un inhibidor de la unió de CaM en les isoformes NOS I i NOS III. D'aquesta forma, la unió Ca^{2+} independent de CaM a NOS2 es produiria per l'especificitat de la seqüència d'unió de la CaM dins de l'estructura primària de NOS II; mentre que en isoenzims que contenen l'insert inhibidor, només

la forma de CaM que uneix Ca^{2+} seria capaç de desplaçar l'insert inhibidor i, per tant, activar l'enzim.

1.3.3. Síntesi de NO a partir de l'oxidació de la L-arginina.

A l'actualitat es desconeix el mecanisme precís de la formació de NO. Tanmateix, els passos químics de formació de NO semblen ser idèntics en les tres isoformes degut al requeriment dels mateixos cofactors. El model més àmpliament acceptat és el de l'oxidació de cinc electrons d'un nitrogen del grup guanidí de la L-arginina, formant NO i el seu coproducte L-Citrulina. Això s'acompanya d'una reducció NADPH-dependent de l'oxigen molecular (Mayer i col, 1991), el qual s'incorpora als dos productes finals de la reacció. Estudis amb NOS I i NOS II indiquen que la síntesi de NO a partir de la L-arginina es realitza en dos passos en els que es produeix N^G -hidroxil-L-arginina com a producte intermedi (Stuerhr i col, 1991^a).

La NOS catalitza l'oxidació de la L-arginina mitjançant l'oxidació (dependent de NADPH) de cinc electrons del grup guanidí de la L-arginina. En el transcurs de dos passos seqüencials d'oxidació, la L-arginina és N-hidroxilada a N^G -hidroxil-L-arginina. Aquest producte intermedi roman unit a l'enzim i és fragmentat mitjançant oxidació per formar L-citrulina i NO. La reacció total comporta la reducció de dues molècules d'oxigen, requerint un total de vuit electrons. Cinc electrons provenen de l'oxidació d'un nitrogen del grup guanidí, mentre que la co-oxidació de NADPH proporciona tres electrons addicionals.

1.3.4. Determinació de la concentració de NO.

1.3.4.1. Determinació de NO en temps real.

Al llarg de l'última dècada s'han descrit diversos mètodes per mesurar la producció de NO en temps real. Aquests assaigs determinen la síntesi de NO en mostres biològiques com teixits, biòpsies o cèl·lules aïllades. Els mètodes electroquímics utilitzen microsensors sensibles a NO, com per exemple elèctrodes porfirínics. El NO també pot ser detectat mitjançant quimioluminiscència, en base a la reacció de NO amb l'ozó donant lloc a NO₂ i llum (Vallance i col, 1995/ Malinski i

col, 1992). Aquest assaig pot utilitzar-se per mesurar NO en mostres biològiques i també en aire exhalat. Finalment la concentració de NO pot ser determinada per espectrofotometria durant la reacció de NO amb oxihemoglobina fèrrica formant nitrats i metahemoglobina (Murphy i col, 1994/Archer i col, 1993). La formació de metahemoglobina pot detectar-se mesurant l'increment d'absorbància a 401 nm.

L'avantatge d'aquests mètodes és que es pot mesurar la formació instantània de NO, mentre que els principals problemes d'aquests assaigs són la complexitat tècnica i la incapacitat de realitzar valoracions de síntesis de NO en fluids orgànics que no tinguin cèl·lules ni teixits productors de NO.

1.3.4.2. Determinació de productes finals estables de l'oxidació de NO

El NO és ràpidament metabolitzat i transformat en els productes finals d'oxidació nitrats i nitrits (NOx). En molts fluids orgànics la majoria dels nitrits passen a formar nitrats. L'assaig més comú de mesura de NO_2^- es basa en la reacció de Griess, específica per a la detecció de NO_2^- i no detecta NO_3^- . Per aquest motiu els nitrats de les mostres han de reduir-se a nitrits; d'aquesta manera la subsegüent determinació de NO_2^- representa la concentració total de nitrits més la concentració de nitrats. La reducció de NO_3^- a NO_2^- pot portar-se a terme mitjançant el tractament de les mostres amb nitrat reductasa (Bories i col, 1995). Els nivells de NOx poden també ser determinats en fluids orgànics mitjançant HPLC, cromatografia d'intercanvi iònic o bé per quimioluminiscència. En aquest darrer mètode els nitrits i nitrats es redueixen a NO, el qual reacciona amb ozó i es detecta per quimioluminiscència.

Aquests mètodes per a la detecció de NOx poden aplicar-se a medis de cultiu o fluids orgànics frescos o congelats com sèrum, plasma, orina, etc. Un dels avantatges d'aquests sistemes és la seva facilitat tècnica així com la seva potencialitat d'automatització. El principal desavantatge és que no permeten diferenciar si l'acumulació de NOx és exclusivament causat per l'activitat enzimàtica de les isoformes de NOS. Tanmateix, la utilització d'inhibidors de NOS permet establir si l'origen de l'acumulació de NOx és òxid nítric-dependent.

1.3.5. Determinació de l'activitat de NOS.

L'activitat enzimàtica de NOS es mesura mitjançant la conversió de L-Arginina (marcada radioactivament) en L-citrulina. Aquest mètode és molt sensible i s'utilitza per a la detecció de l'activitat enzimàtica de NOS en cèl·lules o teixits. Els desavantatges d'aquest mètode són el requeriment de la presència de l'activitat enzimàtica de NOS en mostres biològiques i la necessitat d'infraestructura per la manipulació de material radioactiu.

Avui en dia, la utilització de qualsevol de les tècniques descrites anteriorment per a valorar la producció de NO està àmpliament acceptada per la comunitat científica; encara que l'elecció d'un sistema o altre de detecció depèn del material biològic disponible per l'anàlisi, les necessitats de sensibilitat i especificitat del sistema de detecció, així com també de la rapidesa de l'assaig.

1.3.6. Inhibidors de la NOS.

Els inhibidors de la NOS poden classificar-se en dos grups diferents, els anàlegs estructurals de la L-arginina i els inhibidors no anàlegs de la L-arginina.

Els anàlegs estructurals de la L-arginina entre els que es troben L^G-monometil-L-arginina (L-NMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) i N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) representen una classe d'inhibidors que han estat utilitzats per al bloqueig de l'activitat enzimàtica de les isoformes de NOS (Moncada i col, 1993). La inhibició produïda per aquests anàlegs competeix amb la concentració intracel·lular de L-arginina, indicant que existeix una competència per la unió d'aquestes substàncies al centre catalític de NOS. A més, aquesta inhibició solament es produeix amb els enantiòmers L i no amb les formes D, (D-NNA, D-NMA, etc.), demostrant especificitat d'inhibició.

L'inhibidor L-NMA va ser un dels primers compostos utilitzats com inhibidor de la producció de NO en teixits (Moncada i col, 1991). L-NMA exhibeix una similar capacitat d'inhibició per a les isoformes NOS II i NOS III. A més, estudis recents mostren que L-NMA produeix una inactivació irreversible de les isoformes de NOS II i NOS I. Existeixen evidències que indiquen que els mecanismes d'inhibició de NOS

exercits per L-NNA i el seu éster de metil (L-NAME) difereixen en la forma d'acció en comparació amb el L-NMA. Primerament, L-NNA i L-NAME mostren una selectivitat pronunciada sobre els isoenzims NOS I i NOS III i, a més, la inhibició és reversible després de la depleció de l'inhibidor del medi.

En els últims anys s'ha realitzat un gran esforç per a sintetitzar inhibidors més selectius de la isoforma NOS II que puguin ser aplicables en la clínica per a la prevenció i tractament de malalties causades per una excessiva producció de NO. Entre aquests anàlegs de la L-arginina selectius per a la isoforma NOS II es troba el L-N⁶-(1-Iminoetil)-lisina (L-NIL) (Moore i col, 1994). Aquesta substància és de l'ordre de 30 cops més selectiva actuant com inhibidor de NOS II que inhibint les formes NOS I i NOS III. A més, aquesta substància presenta una major capacitat inhibidora (de l'ordre de sis cops més) sobre NOS II que altres inhibidors com L-NMA o bé L-NNA.

A més dels anàlegs de la L-arginina, la NOS pot inhibir-se per una varietat de compostos de baix pes molecular que interfereixen amb alguna de les funcions catalítiques de l'enzim. Entre aquests compostos destaquen els inhibidors de flavines i antagonistes de la calmodulina (Nathan i col, 1992). Altres drogues modifiquen l'estat redox del grup hemo de l'enzim com l'imidazole, el monòxid de carboni o bé el blau de metilè. Un compost de gran interès degut a la seva selectivitat d'inhibició és l'aminoguanidina (Corbett i col, 1992/ Misko i col, 1993). Fins ara no s'han descrit els mecanismes bàsics a través dels quals l'aminoguanidina exerceix una inhibició selectiva sobre NOS II. Tanmateix, aquesta característica diferencial podria explicar-se atenent a les diferències estructurals localitzades en els llocs d'unió de la L-arginina i del grup hemo de les isoformes de NOS. Aquests canvis estructurals podrien ser els responsables de l'especificitat d'inhibició de l'aminoguanidina sobre la isoforma NOS II.

1.3.7. Regulació de la NOS

L'activitat de NOS pot regular-se a diferents nivells: transcripció, traducció, modificacions post-traduccionals com fosforil·lació, unió de grups prostètics i cofactors, miristil·lació, palmitil·lació, unió a membrana i dimerització.

1.3.8. Distribució tissular de les isoformes de NOS

Nombrosos estudis han tractat de determinar la distribució de les diferents

isoformes de NOS en condicions fisiològiques i fisiopatològiques.

La presència de NOS I ha estat detectada en el cervell de diverses espècies (Mayer i col, 1991/ Bredt i col, 1990). Recentment s'ha pogut comprovar que NOS I també es localitza en neurones específiques del sistema nerviós central, en determinades àrees de la medul·la espinal, en glàndules adrenals, en nervis perifèrics, en cèl·lules epitelials (pulmonars, de l'úter i de l'estómac), en cèl·lules de la màcula densa del ronyó i en cèl·lules d'illots pancreàtics. NOS I també s'expressa en el múscul esquelètic d'humans i de rates (Kobzik i col, 1994)

NOS II pot induir-se en molts tipus cel·lulars mitjançant el tractament adequat amb citoquines, LPS o una altra varietat d'agents. Aquesta isoforma va ser aïllada primerament en macròfags de ratolí (Hevel i col, 1991/Stuehr i col, 1991b). El tractament de rates amb LPS mostrà la presència de l'enzim en macròfags, limfòcits, neutròfils, i eosinòfils de la melsa; en cèl·lules de Kupffer, cèl·lules endotelials i hepatòcits; en macròfags alveolars del pulmó; en macròfags i cèl·lules endotelials de la glàndula adrenal; i en histiòcits, eosinòfils, mastòcits i cèl·lules endotelials (Bandatelova i col, 1993). També s'ha detectat l'expressió de NOS II en astròcits, cèl·lules endotelials vasculars (Kilbourn i col, 1990); cèl·lules musculars llises vasculars i fibroblastes (Gross i col, 1992), condrocits (Charles i col, 1993) i cèl·lules del miocardi (Schulz i col, 1992).

Encara que l'expressió de NOS II en línies cel·lulars humanes és més difícil d'aconseguir que en cèl·lules de ratolí, evidències recents suggereixen que aquesta inducció és possible en condicions d'infecció i d'inflamació. En humans, els cultius primaris d'hepatòcits i condrocits només requereixen IL-1 β a dosis elevades per a induir l'ARNm de NOS II (Geller i col, 1995/ Charles i col, 1993). Altres tipus cel·lulars humans que expressen NOS II són els cultius primaris de cèl·lules epitelials bronquials (Asano i col, 1994); les cèl·lules epitelials de la retina estimulades amb TNF- α , IL-1 β i IFN- γ i els queratinòcits activats mitjançant la unió de IgE al seu receptor de baixa afinitat Fc ϵ R2/CD23, el qual s'indueix després de l'estimulació amb IL-4 (Becherel i col, 1994).

De la mateixa manera, l'expressió de NOS II ha estat examinada en cèl·lules sanguínies humanes. Els monòcits estimulats amb LPS i IFN- γ contenen ARNm de NOS II (Reiling i col, 1994); l'ARNm de NOS II i la proteïna també s'indueixen en neutròfils humans amb una barreja d'IFN- γ , IL-1 i TNF- α (Evans i col, 1996) o en

pacients amb infeccions en el tracte urinari (Wheeler i col, 1997). Així mateix, els macròfags pulmonars de pacients amb tuberculosi clínicament activa presenten activitat enzimàtica de NOS II (Nicholson i col, 1996).

Altres estats patològics associats a la inducció de la NOS II són la cardiomiopatia dilatada i la cardiopatia isquèmica (Haywood i col, 1996). Finalment, mitjançant tècniques de PCR i Western blot s'ha demostrat la presència d'ARNm i proteïna de NOS II i NOS III en plaquetes humanes (Chen i col, 1996).

La forma endotelial de NOS té una localització predominant en l'endoteli vascular. També s'ha identificat per immunohistoquímica la isoforma NOS III en cèl·lules epitelials tubulars del ronyó (Tracey i col, 1994) i en neurones de la zona de l'hipocamp i altres regions del cervell de rata (Dinerman i col, 1994).

1.3.9. Funcions fisiològiques del NO al sistema cardiovascular.

Durant molts anys s'han estat utilitzant drogues vasodilatadores com nitroglicerina, nitroprussiat de sodi, etc., amb finalitat clínica. Fins als inicis de 1980, els mecanismes de vasodilatació produïts per aquests compostos nitrogenats eren desconeguts. L'observació de que el NO, de la mateixa manera que determinats compostos nitrogenats activen la guanilatciclasa i estimulen la producció de GMPc en teixits (Katsuki i col, 1977) portà a considerar a aquestes substàncies com a potents vasodilatadors. Subsegüents estudis revelaren que el NO i també la resta de fàrmacs (nitroglicerina, nitroprussiat..) causen relaxació vascular estimulants la formació de GMPc en la musculatura llisa vascular (Ignarro i col, 1985). El GMPc actua com un segon missatger intracel·lular que ràpidament disminueix els nivells de calci lliure inactivant la quinasa de la cadena lleugera de miosina (Twort i col, 1986). Aquests efectes són atribuïts a l'acció de proteinquinases dependents de GMPc.

En condicions fisiològiques el NO es produeix en els vasos sanguinis per la isoforma NOS III localitzada a les cèl·lules endotelials. L'activitat d'aquest enzim depèn fonamentalment de la presència de Ca^{2+} i calmodulina. En cèl·lules endotelials no estimulades existeix una producció continuada de NO, suggerint que la concentració intracel·lular de Ca^{2+} en condicions basals és suficient per produir l'activació de NOS. Aquesta síntesi basal de NO pot augmentar degut a un increment de la concentració de

Ca^{2+} ocasionat per una estimulació cel·lular mediada a través d'estímuls depenents de receptor. Entre les substàncies capaces de produir un increment en l'activitat enzimàtica de NOS III es troben la bradiquinina, les histamines, i l'acetilcolina. A més d'aquesta vasodilatació produïda per hormones tissulars, altres factors físics poden també produir vasorelaxació mitjançant mecanismes atribuïts al NO. Un d'aquests estímuls receptor-independent és l'estrès de fregament.

L'estrès de fregament exercit en la superfície luminal de l'endoteli pel corrent sanguini, és considerat un dels estímuls fisiològics més importants per a l'alliberament de NO per les cèl·lules endotelials. Qualsevol disminució en el diàmetre del vas sanguini, a flux constant, incrementa l'estrès de fregament al qual la cèl·lula endotelial està exposada alliberant NO, que inhibeix la vasoconstricció original en un procés de retroalimentació. Actualment no es coneix amb precisió el mecanisme pel qual l'endoteli és capaç de respondre al fregament o a deformacions endotelials. Tanmateix, hi ha publicacions que suggereixen que pertorbacions en el citosquelet endotelial o estructures associades, podrien ser responsables de la transmissió de l'estímul de fregament a la NOS III (Hecker i col, 1993).

En la figura 4 es representen els mecanismes mitjançant els quals el NO exerceix el seu efecte vasodilatador sobre els vasos sanguinis. L'activació de l'endoteli vascular per estrès de fregament o per les activacions de receptors produïdes per bradicinina, acetilcolina, etc., produeix un augment intracel·lular de Ca^{2+} . Aquest increment intracel·lular de Ca^{2+} estimula a NOS III, produint NO a partir de L-arginina. El NO produït difon fins les cèl·lules de la musculatura llisa vascular en les quals estimula la guanilato ciclasa soluble produint GMPc. Aquest increment de GMPc en la cèl·lula muscular llisa causa relaxació vascular.

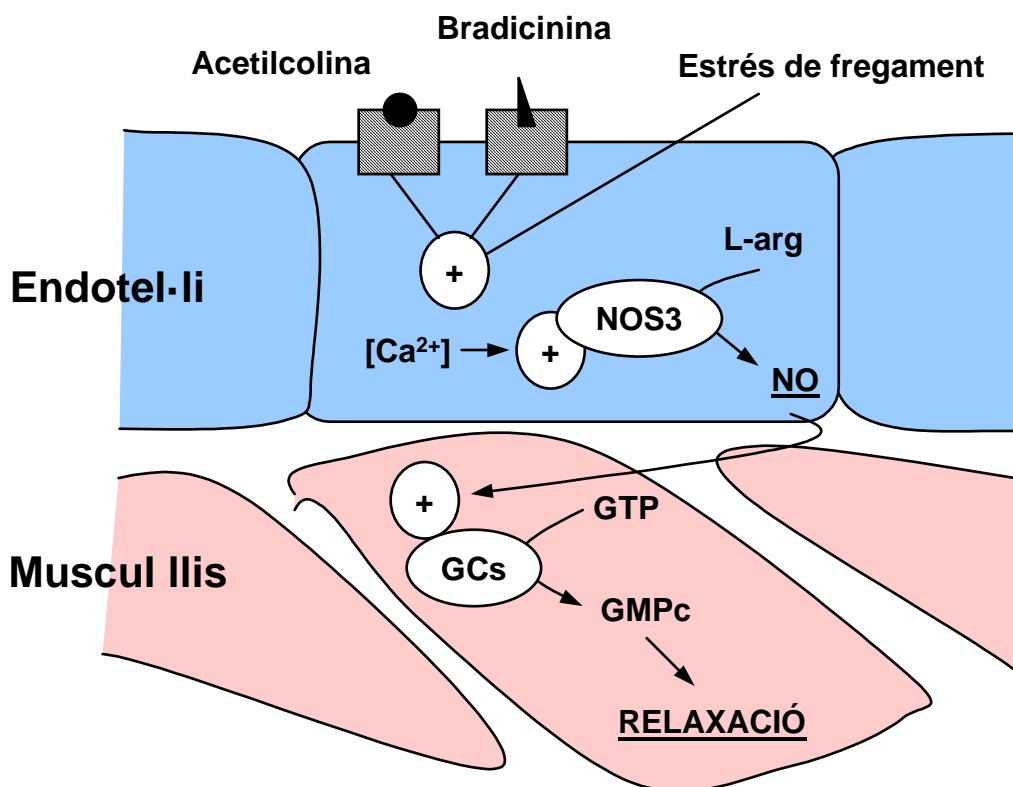


Figura 4. Relaxació vascular mediada per Òxid Nítric.

El NO a part de ser el principal regulador del flux sanguini local (Moncada i col, 1991) realitza altres funcions primordials en el sistema cardiovascular. L'activació plaquetària s'estimula per una sèrie de factors que actuen incrementant la concentració intracel·lular de Ca^{2+} , com la trombina i l'ADP. El NO produït per l'increment cel·lular de Ca^{2+} en les plaquetes, o bé el NO produït en les cèl·lules endotelials veïnes inhibeix l'agregació plaquetària. De nou, la fosforil·lació de la cadena lleugera de la miosina pot ser inhibida, alterant la morfologia plaquetària i disminuint la seva capacitat d'estimulació i per tant d'agregació. Altres funcions a destacar són: la inhibició de l'adhesió de leucòcits a la paret vascular (Moncada i col, 1991), la inhibició del creixement de les cèl·lules musculars llises vasculars (Nakani i cols., 1990) i l'atenuació del to contràctil adrenèrgic dels miòcits cardíacs (Kelly i col, 1996).

1.3.10. Funcions fisiopatològiques del NO al sistema cardiovascular.

En condicions fisiològiques normals, el NO actua com el principal regulador de la contractilitat miocàrdica, del control del to vascular, de les interaccions endoteli-plaquetes i de l'adhesió dels leucòcits a la paret endotelial (Buchwalow i col, 2001). Per tant, no és sorprenent que una mala regulació de la producció del NO comporti importants alteracions fisiopatològiques.

El shock sèptic, que és la conseqüència d'una infecció generalitzada per microorganismes, es caracteritza per vasodilatació arteriolar perifèrica, hipotensió, alteració microvascular i una inadequada perfusió tissular que produeix disfunció orgànica i una mortalitat superior al 50%. L'alliberament d'endotoxines, associada a aquesta condició patològica estimula la producció de citokines pro-inflamatòries (Glausser i col, 1991). Aquestes citokines, juntament amb LPS són capaces d'activar la isoforma NOS II en macròfags i cèl·lules musculars llises. Un cop sintetitzat, NOS II produeix una abundant quantitat de NO, causant vasodilatació i la hipotensió que caracteritza al shock sèptic. Aquest potent efecte vasodilatador del NO podria explicar la resposta atenuada als vasoconstrictors, com la dopamina, que es produeix a la septicèmia. La inhibició de NOS II per inhibidors com glucocorticoides, no només pot revertir la hipotensió induïda per endotoxina (Thiemermann i col, 1990) sinó també restablir la resposta a la teràpia mèdica. Tanmateix, malgrat la millora hemodinàmica la mortalitat en aquests pacients és elevada (Geroulanos i col, 1992).

La hipercolesterolèmia és un conegut factor d'arteriosclerosi i s'ha suggerit que la disfunció endotelial secundària a la hipercolesterolèmia pot estar relacionada amb els mecanismes inicials desencadenants de la malaltia. Aquesta idea es recolza en estudis de Lefer i col, realitzats en 1993, on es demostra que la hipercolesterolèmia produeix una reducció de NO basal en artèria coronària de conill, produint d'aquesta manera adhesió leucocitària. S'ha demostrat també, que la vasodilatació mediada per l'endoteli està atenuada en artèries coronàries humanes ateroscleròtiques (Fostermann i col, 1988). Aquesta disminució de NO en els llocs ateroscleròtics podria promoure aterogènesi permetent l'agregació de plaquetes i leucòcits.

1.4. CITOQUINES

1.4.1. Interleuquina-6

La interleuquina-6 va ser inicialment identificada com una citoquina derivada dels limfòcits T que indueix el pas de maduració final dels limfòcits B en cèl·lules productores d'anticossos.

1.4.1.1. Proteïna:

La IL-6 és una glicoproteïna de 212 aminoàcids que inclou un pèptid de senyal de 28 aminoàcids amb un pes molecular de 21000 Da. Té una estructura terciària en quatre- α -hèlix com es mostra a la Figura 5. (Hirano i col.1986).

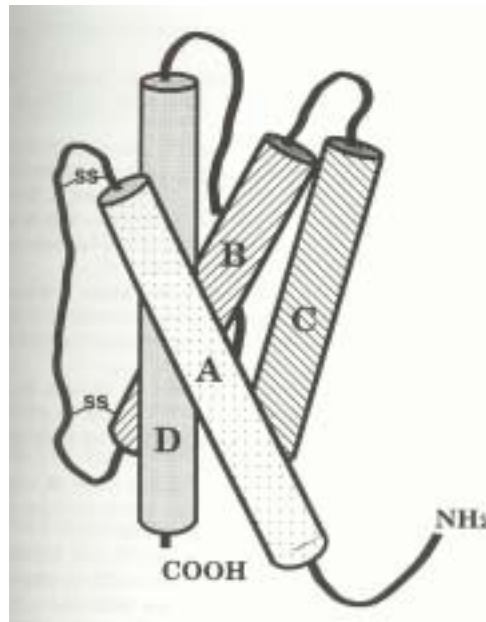


Figura 5. Estructura esquemàtica de la IL-6.

1.4.1.2. Gens i transcripció

El gen de la IL-6 té aproximadament 5 Kb de longitud i consisteix en 5 exons i 4 introns. El gen de la IL-6 es localitza al braç curt del cromosoma 7 (7p21) i la regió proximal del cromosoma 5 respectivament és constitutivament actiu en un nombre de cèl·lules tumorals com el mixoma cardíac i els carcinomes cervical, renal i vesical. Les cèl·lules sanes usualment no produeixen IL-6 a menys que siguin

estimulades de forma apropiada. Els lipopolisacàrids estimulen la producció de IL-6 en monòcits i fibroblasts. Alguns virus, els activadors de l'adenil-ciclasa i la cicloheximida indueixen la producció de IL-6 als fibroblasts. Algunes citoquines com IL-1, TNF i el IFN β estimulen la producció de IL-6 als fibroblasts (Akira i col. 1993).

1.4.1.3. Funció biològica

La IL-6 és una citoquina pleiotròpica que actua en una gran varietat de teixits. En resum, aquesta citoquina regula la resposta inflamatòria, la diferenciació i maduració de les cèl·lules hematopoiètiques i la regulació d'aspectes de la resposta immune. Sembla que, encara que la IL-6 no té o té molt poca toxicitat directa, es pot comportar com un cofactor important a l'expressió de la malaltia.

1.4.1.4. Patologia:

S'ha suggerit que la IL-6 està involucrada en la patogènia de diferents malalties (Akira i col,1993/Kishimoto i col,1989) activació de les cèl·lules policlonals B amb símptomes autoimmunes al mixoma cardíac, carcinoma cervical uterí, artritis reumatoide i SIDA; neoplàsies limfàtiques com el mieloma múltiple i la limfoma de cèl·lules T de Lennert's. La IL-6 també està involucrada en la patogènia de la glomerulonefritis proliferativa mesangial i en el desenvolupament del sarcoma de Kaposi.

1.4.2. Receptors de la interleuquina-6

El receptor de la IL-6 (IL-6R) consta de 468 aminoàcids (Yamasaki i col,1988)(GenBank M20566, X12830). El pes molecular previst per la IL-6R és 50000 Da, encara que el pes molecular observat és 80000 Da degut a la N-glicosilació.

A l'unir-se a la IL-6, el IL-6R a la vegada s'associa amb un receptor de senyal que és el gp130 (Taga i col,1989), el gp 130 no té una capacitat intrínseca d'unió a la IL-6, però està involucrat en la formació de llocs d'unió d'alta afinitat a la IL-6. És a dir, la IL-6 exerceix la seva activitat biològica a través d'un receptor de membrana que consta de dues subunitats anomenades IL-6R i gp130 que actua com a senyal

transductora. Ambdós receptors es solubilitzen una vegada s'han unit a la IL-6, però mentre el sIL-6R és un agonista de la IL-6, el gp130 soluble antagonitza l'acció de la IL-6.

En humans la IL-6R s'expressa en els monòcits i a les cèl·lules T (CD4/CD8), les cèl·lules B no expressen de forma fisiològica aquest receptor, però si que l'expressen quan són estimulats in vitro per un mitogen. Entre les línies cel·lulars, la IL-6R s'expressa a la línia cel·lular B transformada pel EB-virus (CESS), la línia cel·lular T (KT-3), la línia cel·lular del mieloma (U266), la línia cel·lular de l'hepatoma (HepG2, Hep3B) i la línia cel·lular de l'histiocitoma (U937) (Taga i col,1987), d'altra banda, el gp130 s'expressa en gairebé totes les línies cel·lulars humanes.

1.4.3. Factor de necrosis tumoral- α

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) és una proteïna de 17 KDa produïda principalment per macròfags en resposta a una gran varietat d'estímuls.

1.4.3.1. Línies cel·lulars

Apart dels macròfags, hi ha altres tipus cel·lulars que expressen TNF- α com són: cèl·lules citotòxiques, limfòcits B i T, granulòcits, fibroblasts, cèl·lules musculars llises, cèl·lules de la mama, ovari, cèl·lules de tumors glijals, astròcits, cèl·lules de Kupffer, cèl·lules epidèrmiques (A431,KB), adipòcits, cèl·lules de la granulosa (Aggarwal i col,1992/Spriggs i col,1992) i miòcits.

1.4.3.2. Inducció

El TNF- α es produeix en resposta a bacteris Gram negatius i Gram positius i els seus productes (ex. lipopolissacàrids, anàlegs del lípid A), virus (ex. HIV-1), micoplasmes, immunocomplexes, citoquines (ex. GM-CSF, IL-1, IL-2, IFN- δ), cèl·lules tumorals, complement (C5a), neuropèptids, proteïna mielina P2, activadors de la proteinquinasa C, inhibidors de la ciclooxigenasa i factor d'activació plaquetar (Aggarwal 1992; Spriggs i col.1992).

1.4.3.3. Inhibició

La producció de TNF- α és inhibida per la dexametasona, prostaglandina E2, ciclosporina A, inhibidors de la fosfodiesterasa (ex. pentoxifil·lina), inhibidors de la lipooxigenasa, vitamina D3, àcid retinoic, talidomida, antagonistes receptor de la PAF, IL-4 i IL-6 (Aggarwal i col,1992/Spriggs i col,1992).

1.4.3.4. Efectes biològics:

In vitro: El TNF- α és una citoquina multipotencial amb una gran varietat d'efectes biològics. Algunes d'aquestes activitats inclouen inhibició de la proliferació de certes cèl·lules tumorals, estimulació de la proliferació de fibroblasts diploides normals, efectes antivírics contra virus DNA i RNA, inducció de la replicació viral, inducció de les molècules d'adhesió endotelial, inducció de l'activador del plasminogen i el seu inhibidor, activació dels neutròfils, diferenciació de les cèl·lules mieloides i inducció d'altres citoquines (Aggarwal i col,1992/ Beutler i col,1992).

In vivo: El TNF- α té activitats antitumorals contra certs tumors sòlids, indueix tumorogènesis, metàstasis, actua com un immunomodulador, indueix shock sèptic, febre, juga un paper a l'esclerosi múltiple i està involucrat en l'autoimmunitat i en les infeccions bacterianes, per paràsits i virals. Les accions del TNF- α al sistema cardiovascular són: Disminuir la contractilitat, vasodilatar, augmentar la permeabilitat vascular i produir caquèxia. (Deswal i col,2001)(Funakoshi i col,2002).

1.4.4. Receptors del factor de necrosis tumoral

S'han identificat dos tipus de receptors del TNF- α amb pesos moleculars de 55-60 KDa (p60, tipus I o B) i 75-80 KDa (p80, tipus II o A). El p60 s'expressa principalment a cèl·lules epitelials, mentre que el p80 s'expressa sobretot a les cèl·lules mieloides. El TNF s'uneix al p60 i p80 amb igual afinitat. La seqüència d'aminoàcids del domini extracel·lular dels dos receptors és rica en cisteïna i és un 25% homòloga, però els dominis citoplasmàtics no són homòlegs entre ells, ni amb altres receptors.

L'expressió a la superfície de la cèl·lula del receptor es regula per una varietat d'agents que inclouen les citoquines (ex. interferons, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-

α i GM-CSF), proteinquinasa i els activadors PK-A, agents despolimeritzadors dels microtúbuls i esteroides. L'expressió a la superfície de les cèl·lules dels receptors del TNF- α sembla ser un requeriment per la seva acció biològica però no és suficient (Tsujiimoto i col,1992/Smith i col,1992). Encara que ambdós receptors poden traduir un factor transcripcional, el factor NF-KB, la majoria d'efectes biològics del TNF- α estan mediat pel receptor p60.

1.5. MITOCÒNDRIA

1.5.1. Funcionalisme mitocondrial

1.5.1.1. Estructura de la mitocòndria

La mitocòndria és una organel·la cel·lular que disposa de dues membranes, interna i externa, que delimiten l'espai intermembranós. Aquest conté l'enzim adenilat-ciclasa, i la seva funció és mantenir un balanç adequat de nucleòtids d'adenina a l'organel·la. A l'exterior de la membrana externa es troba el citoplasma cel·lular i dintre de la membrana interna es configura un espai anomenat matriu mitocondrial, que conté DNA i RNA, on es produeixen les reaccions del cicle de Krebs.

La membrana mitocondrial externa és en molts aspectes diferents a la membrana interna; té nombrosos enzims (fonamentalment monoaminoxidasa i NADH-citocrom C reductasa insensible a la rotenona), encara que cap d'elles està relacionada directament amb la generació de ATP, és molt permeable i relativament rígida. La membrana mitocondrial interna té, al contrari, una permeabilitat extraordinàriament baixa i dibuixa nombroses invaginacions (crestes) que augmenten considerablement la seva superfície. La penetració de substractes és controlada de forma acurada i la majoria s'efectuen per sistemes de transport específics. Conté quatre complexos enzimàtics que són responsables de la fosforil·lació oxidativa que és la funció més important de la mitocòndria.

1.5.1.2. Transport mitocondrial

El paper altament especialitzat de la mitocòndria en el metabolisme fa que

només certs substrates, cofactors i metalls siguin capaços d'accedir al seu interior. Els substrats més importants són el O₂, H₂O, ADP, fosfat, piruvat i àcids grassos; al mateix temps, altres productes, com el CO₂ i el ATP, han de ser transportats fora de la mitocòndria.

L'anàlisi del transport de certs substrats és d'interès per entendre algunes anomalies del funcionament mitocondrial, ja que en determinades malalties l'únic factor limitant és un trastorn d'aquest transport.

La membrana mitocondrial, a l'igual que la resta de membranes cel·lulars de l'organisme està constituïda per una doble capa fosfolipídica que engloba una banda proteica. El 70% correspon a proteïnes i el 30% a lípids; d'aquests el 40% és fosfatidilcolina, el 35% fosfatidiletanolamina i el 15% cardiolipina (Hatefi ,1985). La capa fosfolipídica actua de barrera evitant la difusió de substrats hidrofílics però permetent, en canvi, el pas d'altres de caràcter hidrofòbic. Els substrats amb càrrega elèctrica i els neutres també poden penetrar a través de la membrana utilitzant determinades proteïnes anomenades transportadores (carrier). Aquest sistema s'anomena "difusió facilitada", si no requereix energia pel seu funcionament o "transport actiu", si aquest transport depèn d'una reacció que precisa energia. Finalment, un substrat pot requerir una modificació química per poder ser incorporat a l'interior de la mitocòndria (translocació de grup) (Fig.6).

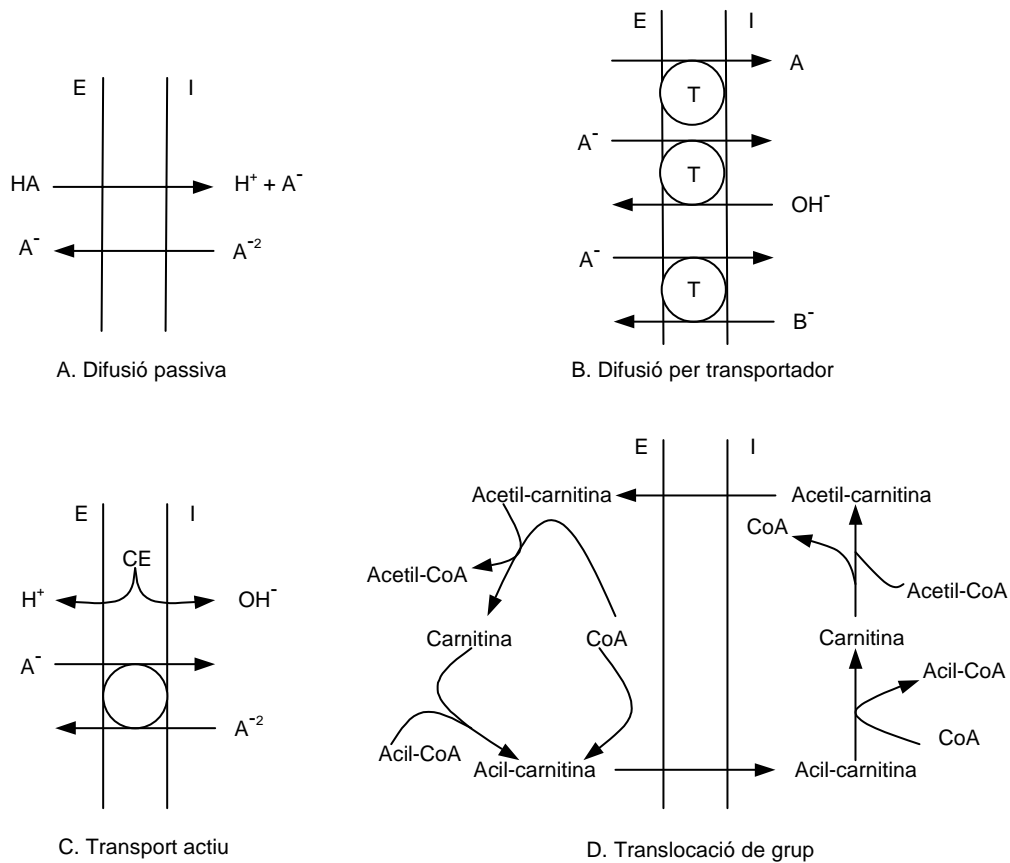


Figura 6. Tipus de transport mitocondrial.

1.5.1.3. Cicle de Krebs.

La via glucolítica és utilitzada per tots els teixits per l'oxidació de la glucosa, el qual proporciona l'energia requerida per les diverses reaccions metabòliques de l'organisme. El piruvat és el producte final de la glucolisis en aquells teixits que tenen mitocòndries i que disposen, a més a més, d'un aport suficient d'oxigen. Aquesta sèrie de reaccions s'anomena glucolisis aeròbia i té com a finalitat permetre la descarboxilació oxidativa del piruvat en acetil-CoA, que és el combustible més important pel cicle de Krebs.

El cicle de Krebs té com a funció l'oxidació de l'acetil-CoA en CO_2 i H_2O . L'oxidació de l'acetil-CoA consumeix els dos terços del total d'oxigen i proporciona els dos terços del total de ATP produït. Aquest cicle té lloc exclusivament a la matriu mitocondrial.

L'oxidació d'una molècula de NADH per la cadena respiratòria mitocondrial condueix a la formació de 3 molècules de ATP, mentre que l'oxidació de $FADH_2$

forma dues molècules de ATP. En conseqüència, el total de molècules de ATP formades serà de 12 per cada una de acetil-CoA oxidada.

1.5.1.4. Cadena respiratòria mitocondrial

Els cofactors reduïts (NADH i FADH₂) que s'alliberen durant la sèrie de reaccions del cicle de Krebs proporcionen cada un, un parell d'electrons a un conjunt lipoproteic ubicat a la membrana interna de la mitocòndria i que es troba especialitzat en el transport d'electrons; és el que s'anomena cadena de transport d'electrons o cadena respiratòria mitocondrial. Els electrons passen d'un component al següent d'aquesta cadena fins arribar al final de la mateixa, on es combinen amb l'oxigen i protons per formar H₂O. A mesura que els electrons passen d'un component a l'altre perden la major part de la seva energia, la qual pot ser capturada i emmagatzemada en forma de ATP a partir del ADP i el fosfat inorgànic (P). Aquest procés s'anomena fosforilació oxidativa. La resta d'energia es perd en forma de calor.

1.5.1.4.1. Components de la cadena respiratòria mitocondrial:

Funcionalment, el sistema de la cadena respiratòria mitocondrial, ubicat a la membrana interna de la mateixa, està formada per cinc complexos enzimàtics lipoproteics. Aquests complexos estan formats per diferents subunitats que són codificades en part pel DNA nuclear i en part pel DNA mitocondrial. La seva denominació és bàsicament la següent encara que poden rebre altres noms: NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complexe I); succinat: ubiquinona oxidoreductasa (complexe II); ubiquinol: ferro-citocrom c oxidoreductasa (complexe III), ferrocitocrom c: oxigen oxidoreductasa (complexe IV) i ATP sintasa (complexe V). (Taula IV)

Taula IV. Pes molecular, polipèptids i grups prostètics dels diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial

Complexe	Número de polipèptids	Subunitats codificades pel DNAm	Grups prostètics
I	40	7	FMN-Fe-S
II	4	0	FAD, Fe-S, hemb580
III	9	1	Hemb582, b568, C1, 2Fe-2S.
IV	13	3	Hem aa3, Cu.
V	12	2	Nucleòtids d'adenina, Mg ²⁺

1.5.1.4.2. Funcionalisme de la cadena respiratòria mitocondrial

En el primer pas, el NADH és reduït a NAD per una deshidrogenasa (Champe i col, 1987, Durand i col, 1986), la qual arrenca dos àtoms d'hidrogen del seu substrat. Ambdós electrons i un protó són transferits al NAD⁺, amb el que es forma NADH més un protó lliure, H⁺, el qual s'allibera al medi.

Aquest protó lliure més l'hidrur (H⁻) que transporta la NADH són transferits, seguidament, a la NADH deshidrogenasa o complexe I, un enzim situat dins de la membrana interna mitocondrial i que utilitza com a cofactor la FMN, la qual accepta els dos àtoms d'hidrogen i es converteix en FMNH₂. El complexe II accepta un electró del succinat i converteix la FAD en FADH₂ a través de la succinatdeshidrogenasa.

La FMNH₂ i la FADH₂ transfereixen els àtoms d'hidrogen al coenzim Q o ubiquinona. A continuació, aquests electrons passen successivament pels citocroms b i c1 del complexe III, citocrom c i citocroms a+a3 del complexe IV. Els citocroms són proteïnes que contenen un grup hemo, que està format per un anell porfirínic que conté un àtom de ferro; aquest àtom de ferro és convertit de forma reversible de fèrric (Fe³⁺) a ferrós (Fe²⁺), actuant així com un transportador d'electrons

reversible.

El citocrom a3, que conté àtoms de coure, és l'únic que pot reaccionar directament amb l'oxigen molecular i juntament amb els protons lliures produeix H₂O (Figura 7).

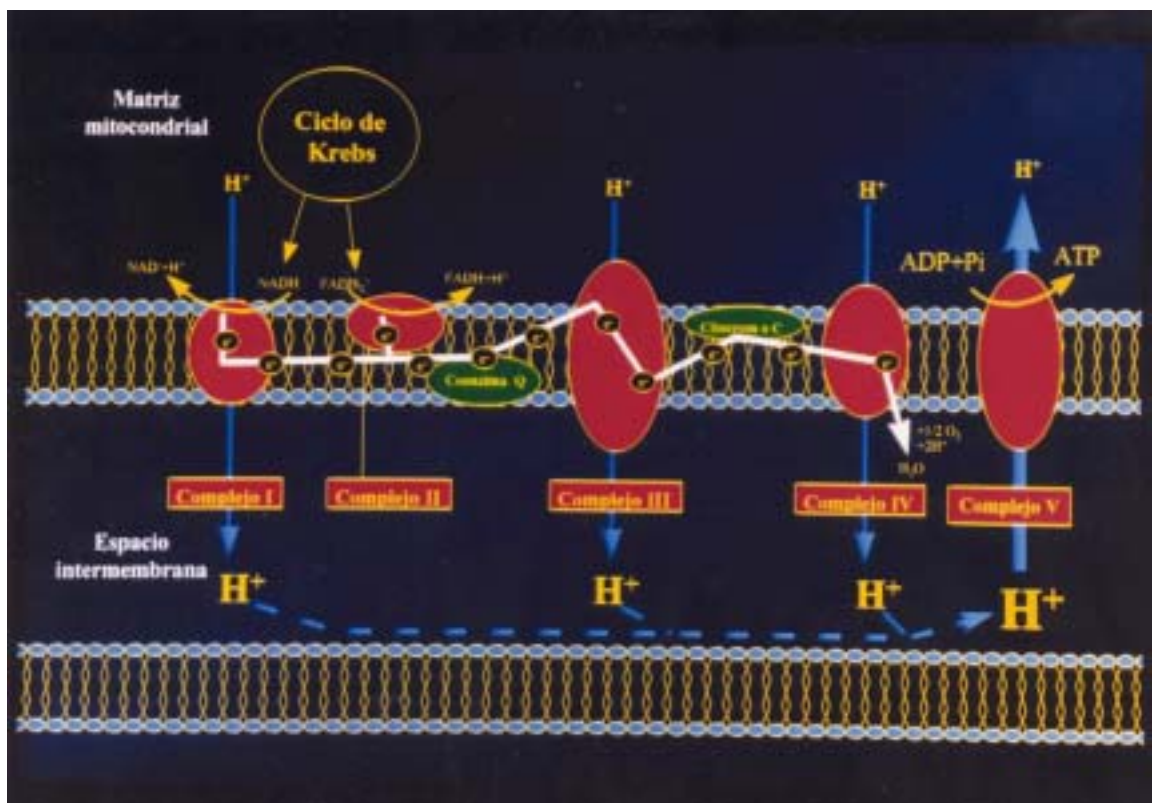


Figura 7. Funcionalisme de la cadena respiratòria mitocondrial.

1.5.1.5. Fosforilació oxidativa.

Els components de la cadena de transport d'electrons, amb les reaccions detallades a l'apartat anterior, permeten l'extrusió de protons (H⁺) des de la matriu mitocondrial al citoplasma cel·lular. Aquests protons poden a la vegada per la diferència de gradient elèctric (quimiosmòtic) que es crea, penetrar de nou a l'interior de la matriu mitocondrial a través d'un canal que conté la molècula ATP-sintasa; en conseqüència, es sintetitza ATP a partir de ADP i P (fosforilació oxidativa).

En condicions normals, el transport d'electrons i la fosforilació oxidativa són dos processos que es troben estretament acoblats, és a dir, si un es para per

qualsevol raó, l'altre també ho fa. Aquesta situació es pot modificar mitjançant substàncies que augmenten la permeabilitat de la membrana interna mitocondrial als protons (2,4-dinitroferol, CCCP), produint-se l'anomenat desacoblament. Això permet la ràpida entrada de protons a la matriu mitocondrial per qualsevol regió de la membrana interna, sense establir-se el gradient de protons; en conseqüència, l'energia produïda pel transport d'electrons a través de la cadena respiratòria mitocondrial és alliberada en forma de calor en comptes de sintetitzar-se ATP.

1.5.2. Defectes primaris de la cadena respiratòria mitocondrial

La cadena respiratòria mitocondrial (CRM) ha d'estar intacta per aconseguir una òptima producció de ATP durant la respiració aeròbica, ja que una deficiència greu de la mateixa pot comprometre la funció cel·lular en no haver-hi un aport suficient de ATP. Els defectes funcionals de la CRM poden ser específics d'un complex o implicar deficiències múltiples (Cadademont i col, 2002)(Marin-García i col, 2002). La seva presència no suposa necessàriament el desenvolupament d'un quadre clínic concret, encara que alguns fenotips s'associen freqüentment amb un patró determinat d'anomalies bioquímiques. Genèticament aquestes anomalies s'engloben sota el concepte de citopaties mitocondrials. En aquest apartat s'aprofundirà en l'alteració bioquímica subjacent i en les característiques clíniques que l'acompanyen (Taula V).

Taula V. Espectre de síndromes clíniques associades a una deficiència primària de l'activitat dels complexos de la CRM.

Complexe deficitari	Miopatia	Encefalomiopatia	Cardiopatia
I	Miopatia pura amb intolerància a l'exercici i miàlgia	MELAS MERF Acidosi làctica congènita Hipotonia Insuficiència respiratòria Poliodistròfia infantil progressiva (sd. Alpers) Intolerància a l'exercici Debilitat muscular Oftalmoplègia externa progressiva Atròfia òptica Sordesa Atàxia Demència Atròfia òptica de Leber Sd de Kearns-Sayre	
II	Miopatia pura amb intolerància a l'exercici i miàlgia	Debilitat muscular Sd de Fanconi Demència Atàxia Epilèpsia mioclònica Sd de Leigh	Miocardiopatia infantil Mioglobinúria
III	Miopatia pura amb intolerància a l'exercici i miàlgia	Intolerància a l'exercici Debilitat muscular Oftalmoplègia externa progressiva Atròfia òptica Sordesa Atàxia Signes piramidals	Miocardiopatia infantil
IV	Miopatia infantil mortal Miopatia infantil benigna Oftalmoplègia externa progressiva crònica	MERRF MELAS Sd de Leigh Sd d'Alpers Sd de Menkes Sd de Kearns-Sayre	
V	Miopatia pura	Debilitat muscular Atàxia Demència Neuropatia perifèrica Sd. de Leigh	

La identificació dels llocs de bloqueig bioquímic a la CRM es realitza utilitzant diferents tècniques, entre les que destaquen les histològiques i les bioquímiques. Hi ha tècniques histològiques específiques aplicades sobre teixit muscular, que permeten apreciar alteracions a l'activitat de la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complexe I), la succinat ubiquinona oxidoreductasa (complexe II), o la ferrocitocrom c oxigen oxidoreductasa (complexe IV). Els estudis bioquímics inclouen l'anàlisi polarogràfic de l'oxidació de substrats per algun dels components de la CRM i l'anàlisi espectrofotomètric de l'activitat específica de cada un dels complexos enzimàtics que la formen (Byrne i col, 1885/ Cardellach i col, 1992). A l'actualitat, aquests estudis poden realitzar-se en mitocòndries aïllades a partir de petites quantitats de teixits (200-400 mg), en homogenats de cèl·lules aïllades (tals com limfòcits) o en cèl·lules en cultius (Rustin i col, 1994).

1.5.2.1. Deficiències del complex I

Les deficiències a l'activitat del complex I (CI) condicionen principalment el desenvolupament de miopatia pura, si bé en ocasions l'espectre de manifestacions clíniques pot ser multisistèmic (Arts i col,1993/ Morgan-Hugues i col, 1988). Els símptomes apareixen a la infantesa o a l'adolescència i es caracteritzen per fatiga muscular i intolerància a l'exercici. Els estudis histològics de la biòpsia muscular mostren la presència de fibres vermelles desestructurades. De vegades s'associa a acidosis làctica, hipotonia i insuficiència respiratòria (Moreadith i col,1984/ Robinson i col, 1989). En diversos casos el dèficit s'ha descrit associat a una deficiència parcial del complex IV (Robinson i col,1989/ Johnson i col, 1983). El patró de transmissió genètica és variable, apareixent tant casos esporàdics com d'herència materna. Els pacients amb deficiències de l'activitat del complex I desenvolupen molt freqüentment una disfunció del sistema nerviós central. També és freqüent en pacients amb oftalmoplègia externa progressiva congènita associat a deleccions al DNA mitocondrial (DNAm_t) que comprometen gens que codifiquen per subunitats del complex I. En alguns casos de diverses malalties degeneratives com la malaltia de Huntington o la de Parkinson, també s'han descrit defectes en el complex I de la CRM.

1.5.2.2. Deficiències del complexe II

Les deficiències selectives del complexe II (CII) són rares. El seu espectre clínic concorda amb el d'altres deficiències de la CRM: inici d'una miopatia a la infantesa o l'adolescència, ja sigui de forma pura (Sengers i col, 1983) o bé associada a miocardiopatia (Reichmann i col, 1994) o a mioglobínúria amb activitat aconitasa deficient (Hall i col, 1993).

Totes les subunitats del complexe II són codificades per gens nuclears, per això el dèficit d'aquest complexe s'hereda de forma autossòmica.

1.5.2.3. Deficiències del complexe III

Les deficiències del complexe III (CIII) apareixen sovint englobades en una disfunció més generalitzada de la CRM (Hall i col,1993/ Figarella-Branger i col, 1992). Aquest tipus de dèficit sol donar lloc a dos tipus diferents de síndrome clínic: una caracteritzada per miopatia, que apareix a la primera infantesa o adolescència i sol presentar afectació de la musculatura ocular extrínseca (Kennaway i col,1988/ Reichman i col,1986); i un altre caracteritzat per una encefalomiopatia en que a més a més de la síndrome miopàtica apareix degeneració retinal, sordesa, atàxia, demència i signes piramidals en combinacions variables (Morgan-Hugues i col, 1984). També està descrit un dèficit a l'activitat del complexe III en un pacient afectat de miocardiopatia idiopàtica (Papadimitriou i col, 1984). En alguns d'aquests casos s'han trobat alteracions en el DNA mitocondrial tipus deleccions, duplicacions o una combinació d'ambdues.

1.5.2.4. Deficiències del complexe IV

Les deficiències del complexe IV (CIV) són les més freqüents, i això ha portat a una classificació de les mateixes des d'un punt de vista clínic, bioquímic i genètic (Taula VI).

Taula VI. Malalties mitocondrials que inclouen una deficiència del complex IV aïllada o en associació amb deficiències a l'activitat d'altres complexos de la CRM.

Lloc de l'efecte (herència)	Manifestacions clíniques	Bioquímica
DNA nuclear (mendeliana)	Miopatia infantil fatal Miopatia i cardiomiopatia infantil Miopatia infantil benigna Miopaties de l'adult Sd de Leigh Encefalomiopatia neurogastro- Intestinal mitocondrial	Monoenzimopatia específica del teixit o generalitzada
DNA mitocondrial (materna o casos esporàdics)	Sd de Kearns-Sayre Sd de Pearson Oftalmoplègia externa progressiva MERRF	Monoenzimopatia o multienzimopatia generalitzades
Comunicacions entre els genomes nuclear i mitocondrial (mendeliana)	Oftalmoplègia externa progressiva congènita Miopatia, nefropatia o hepatopatia infantils mortals	Multienzimopatia específica de teixit o generalitzada

Les atribuïdes a un defecte en un gen nuclear i transmeses per herència mendeliana es presenten en síndromes tals com:

Miopatia infantil greu, caracteritzada per hipotonia, debilitat i acidosi làctica des del naixement, en ocasions associada a la síndrome de Toni-Fanconi, i mort per insuficiència respiratòria abans del primer any (Zeviani i col, 1985);

Miopatia i cardiomiopatia infantil (Zeviani i col 1, 1986);

Miopatia infantil benigna, en la que els pacients tenen debilitat muscular

intensa i sovint necessiten ventilació assistida, però als 2-3 anys de vida milloren i la deficiència de COX (ciclooxigenasa) reverteix (DiMauro i col, 1983);

Miopaties que es desenvolupen a la vida adulta (Haller i col, 1980);

Defectes combinats de diversos complexos que es presenten a la síndrome de Leigh (encefalomiopatia necrosant subaguda) i en altres encefalopaties tals com l'anomenada neurogastrointestinal mitocondrial (Bardosi i col, 1987).

Les deficiències de l'activitat de la COX associades a defectes en el DNAm inclouen gairebé tots els casos de síndrome de Kearns-Sayre o d'oftalmoplègia externa progressiva (Johnson i col, 1983). La majoria d'aquests pacients presenten delecions de gran tamany en el seu DNAm que comprometen gens de diverses subunitats de la COX.

1.5.2.5. Deficiències del complex V.

La major part dels casos descrits (miopaties pures, síndrome de Leigh, etc) combinen deficiències de diversos complexos (Wallace i col, 1988). Una deficiència específica del complex V (CV) s'ha descrit en una dona amb debilitat a les extremitats i presència de fibres vermelles desestructurades (Schotland i col, 1976) i en un nen amb debilitat i deficiència de carnitina muscular que posteriorment va desenvolupar demència, atàxia i neuropatia perifèrica (Smyth i col, 1975).

1.5.3. Malalties cardíques associades a defectes de la cadena respiratòria mitocondrial.

1.5.3.1. Miocardiopatia dilatada i alteracions mitocondrials.

És conegut que en algunes citopaties mitocondrials el cor constitueix un dels òrgans diana (Anan i col, 1995) i hi ha alguns treballs que suggereixen que un subgrup de pacients afectats de miocardiopatia dilatada idiopàtica poden patir una citopatia mitocondrial (Ozawa i col, 1990/ Hattori i col, 1991/ Marín-García i col, 1994/ Suomalainen i col, 1992/ Li i col, 1995). Aquest fet es fonamenta en la troballa de quantitats variables de DNA mitocondrial del·leccionat en els miocardiocits d'aquests

pacients, dels que podrien derivar-se alteracions de la cadena respiratòria mitocondrial. La quantitat de DNA mitocondrial del·leccionat és petita i és difícil deduir implicacions patogenètiques de causa-efecte sobre la cadena respiratòria mitocondrial, ja que en persones sanes d'edat avançada també poden detectar-se les mateixes alteracions. Contràriament, Suomalainen i col (1992) han descrit una dona i el seu fill afectat per una miocardiopatia dilatada idiopàtica, trobant-se en el fill (la mare no va poder ser estudiada) un percentatge de DNA del·leccionat al cor i al múscul esquelètic del 50% i el 65% respectivament. Hi ha un únic estudi del comportament dels enzims de la cadena respiratòria mitocondrial en un pacient amb miocardiopatia dilatada (Marín-García i col,1994). En aquest estudi es va constatar un important descens a l'activitat dels complexos I, III i V i l'anàlisi del DNA mitocondrial va mostrar una del·lecció de 4,7 Kb que incloïa subunitats de tots els complexos anteriorment mencionats.

2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

HIPÒTESI DE TREBALL

La hipòtesi general de l'estudi és que a la MCDI la presència de la sintetasa induïble de l'òxid nítric (NOS II) a nivell del miòcit, pot estar condicionada per la presència de citoquines alliberades durant un procés inflamatori. L'augment d'òxid nítric (NO) secundari a la NOS II afectaria negativament la contractilitat miocàrdica. Si aquesta hipòtesi és certa, les citoquines s'haurien d'expressar i estar elevades en fases més inicials de la malaltia. D'altra banda el mecanisme d'actuació de l'òxid nítric per produir disfunció miocàrdica podria ser la interacció entre el NO i els enzims de la cadena respiratòria mitocondrial.

OBJECTIUS

Aprofundir en el coneixement de l'etiopatogènia de la miocardiopatia dilatada (MCDI) analitzant:

1. Expressió del mRNA de la sintetasa induïble de l'òxid nítric (NOS II) al miocardi de pacients amb MCDI.
2. Producció de nitrits/nitrats (NO₂-NO₃) a sèrum com a resultat de la inducció de la NOS II.
3. Patró de citoquines en sèrum en pacients amb MCDI en diferents fases evolutives de la malaltia, així com la seva relació amb l'expressió de la NOS II. En concret s'analitzaran les següents citoquines: sIL-2R, IL-6, TNF- α , sIL-6R, TNF-IR, TNF-IIR.
4. Activitat dels enzims de la cadena respiratòria mitocondrial a la MCDI com a últim mecanisme sobre el que actua el NO.

3. DISCUSSIÓ

3.1. NOS II A LA ICC

A la patogènia de la miocardiopatia dilatada idiopàtica (MCDI), s'han involucrat diferents mecanismes com factors familiars i genètics, alteracions metabòliques i immunològiques, disfunció energètica i insults citotòxics. Les troballes d'aquest estudi demostren l'existència d'expressió de NOS II en mostres del ventricle de tots els pacients amb MCDI, però molt rarament en pacients amb miocardiopatia dilatada d'origen isquèmic o infart agut de miocardi i mai en els controls, aquest fet suggereix que el NOS II té un paper important a la patogènia de la MCDI.

A la literatura l'expressió de NOS II als pacients amb ICC ha estat tema de controvèrsia (Haywood i col, 1996; Fukuchi i col, 1998; Drexler i col, 1988). Probablement els diferents resultats es deuen a que la població estudiada amb ICC no és homogènia, doncs hi ha pacients amb ICC en diferents classes funcionals de la NYHA (II-IV), mentre que en el present estudi tots els pacients seleccionats estaven en CF IV i a la vegada els pacients controls (donants) també van ser seleccionats en base a l'absència d'infecció, ni malalties concomitants que poguessin alterar el resultat i tampoc haguessin estat ventilats mecànicament més de 12 h.

El fet de que la població d'aquest estudi fos tan homogènia (a diferència dels estudis citats) podria explicar la diferència amb els resultats d'algun d'aquests autors.

Una altra evidència que recolza aquesta expressió de NOS II a la MCDI és l'augment de les concentracions sèriques de NO_x . Encara que en aquest estudi no s'hagin realitzat determinacions directes de l'activitat del NOS II, s'han mesurat les concentracions sèriques de NO_x com un mètode indirecte de l'activitat de la NOS II (Winlaw i col, 1994).

3.2. CITOQUINES I NOS II A LA ICC

S'ha demostrat que diferents citoquines com la interleuquina- 1β (IL- 1β) i el TNF- α poden causar expressió de la NOS II en els cardiomiòcits d'alguns animals (Tsuji i col, 1994; Satoh i col, 1997). Altres estudis (Schulz i col 1992) han suggerit que la síntesi d'òxid nítric a l'endocardi i miocardi regulen la funció cardíaca d'una

forma paracrina i autocrina. També s'ha demostrat que en condicions que s'associen amb nivells plasmàtics elevats de citoquines, com el shock sèptic, es produeix una depressió de la contractilitat miocàrdica (Kilbourn i col, 1990).

S'ha suggerit (De Belder i col, 1993) que una disfunció miocàrdica severa es pot atribuir a una producció excessiva de NO com a conseqüència de l'expressió de la NOS-II al miocardi i als vasos induïda per citoquines. Més recentment (Sato i col, 1997) demostrà que la NOS II es coexpressa amb el TNF- α al teixit miocàrdic obtingut d'un subgrup de pacients amb MCDI i disfunció ventricular moderada-severa. Per tot això podem dir que l'expressió de la NOS II induïda per citoquines, comporta una excessiva producció de NO al miocardi i que aquest pot reduir la contractilitat cardíaca i canviar la morfologia ventricular.

Cal també destacar que el NO pot actuar per diferents mecanismes, com és la mort cel·lular programada (apoptosi), efectes citotòxics, regulant el consum d'oxigen per part del miòcit i inhibint la resposta inotropa positiva a l'estimulació β -adrenèrgica (Drexler i col, 1988). Tots aquests mecanismes poden conduir a una disfunció miocàrdica i per tant afectar el pronòstic dels pacients amb ICC.

Per tant és important centrar el paper que tenen les citoquines en la disfunció ventricular en els pacients amb ICC. Els nostres resultats demostren que determinades citoquines (IL-6, TNF- α , sIL-2R) estan elevades al sèrum dels pacients amb ICC i que els nivells són més elevats a mesura que empitjora la CF de la NYHA. Aquests resultats són coherents amb altres estudis (Levine i col, 1990; Ferrari i col, 1995 i Munguer i col, 1996).

3.3. CITOQUINES ACTIVACIÓ NEUROHORMONAL I ICC. VALOR PRONÒSTIC

Estudis previs indiquen que l'activació de citoquines perifèrica és independent de l'etiologia de la ICC (Torre-Amione i col, 1996; Testa i col, 1996).

En el nostre estudi la IL-6 va ser identificada en els pacients amb ICC com el predictor independent més important de noves descompensacions, mort o necessitat de trasplantament cardíac. La IL-6 fou un predictor millor que el TNF- α , les neurohormones plasmàtiques o la funció ventricular esquerra. Per tant la IL-6 pot ser

útil per identificar els pacients amb pitjor pronòstic.

Alguns estudis han analitzat el poder predictiu de la IL-6 elevada en els pacients amb ICC. Encara que la relació entre l'activació de les neurohormones plasmàtiques i l'alliberació de citoquines no es coneix bé, els resultats del nostre estudi indiquen que l'angiotensina II, l'activitat de la renina plasmàtica i la noradrenalina són predictors d'increment d'IL-6, suggerint una relació entre les neurohormones i l'activació de les citoquines. Les neurohormones també són predictors dels nivells elevats en sèrum de sIL-2R, el TNF- α i els seus receptors solubles I i II. Aquests resultats són similars als de Koller-Strametz i col (1998), que també va demostrar una correlació significativa entre la IL-6 i el TNFR-II.

Per tant, donat que les citoquines poden actuar localment com a reguladors dels leucòcits (altres citoquines i cèl·lules endotelials) de forma paracrina i autocrina és possible que la seva activació pugui donar lloc amb un augment de l'alliberació de la IL-6 i aquesta de forma secundària induir la NOS II.

El nostre estudi també demostrà que el TNF- α , els seus receptors I i II, IL-1 β i la sIL-2R s'associaven de forma univariada també a més morbiditat durant el seguiment, però eren predictors menys importants de mal pronòstic que la IL-6, mentre que els receptors del TNF- α eren millors predictors de complicacions que el TNF- α per ell mateix. Ferrari i col han publicat també un resultat similar en pacients amb insuficiència cardíaca severa. Degut a que les accions del TNF s'inicien lligant-se als receptors de la membrana cel·lular, els receptors del TNF poden actuar com inhibidors competitiu dels receptors cel·lulars, modulant així la resposta activada.

Lommi i col (1997) postulen la hipòtesi de que l'activació de les citoquines és un mecanisme compensador en el context d'una vasoconstricció severa induïda per l'angiotensina II i la noradrenalina.

Encara que la relació entre l'activació de les neurohormones plasmàtiques i l'alliberació de citoquines no està encara ben establerta, els resultats d'aquest estudi indiquen que l'angiotensina II, l'activitat de la renina plasmàtica i la noradrenalina eren predictors de valors més elevats d'IL-6, suggerint una relació entre les neurohormones i l'activació de les citoquines. Recentment, també Tsutamoto (1998)

ha trobat una correlació significativa entre els nivells d'IL-6 i la noradrenalina plasmàtica. Per tant, es creu que l'activació del sistema nerviós simpàtic que dona vasoconstricció pot desencadenar l'activació local d'IL-6 a nivell de les cèl·lules musculars llises vasculars o a nivell endotelial com a mecanisme compensador induint la vasodilatació dependent de l'òxid nítric. A més a més, donat que l'activació de la IL-6 pot derivar-se dels leucòcits i els leucòcits també estan regulats per les catecolamines, l'activació augmentada del sistema nerviós simpàtic que es produeix a la insuficiència cardíaca pot jugar un paper a l'activació de la IL-6.

3.4. NO I CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL

El paper del NO en el control del metabolisme mitocondrial no està ben establert. Grayer i col van demostrar una interacció entre el NO i els enzims mitocondrials en estudis amb cultius cel·lulars de macròfags citotòxics sobre cèl·lules neoplàssiques. Els macròfags induïen una reducció del transport d'electrons mitjançant la inactivació dels complexos I i II de la cadena respiratòria i de l'aconitasa del cicle de Krebs. Aquest efecte es va demostrar que era dependent de la L-arginina, inhibida pels bloquejadors i que s'inhibia pels bloquejants de la NO sintasa i per tant que era dependent del NO.

Estudis com el de Cleeter i col (1994) han demostrat una interacció fisiològica del NO amb altres enzims respiratoris. En aquest estudi es va veure que concentracions nanomolars de NO competien de forma reversible amb l'oxigen pel lloc d'unió amb la citocrom C oxidasa, inhibint el transport d'electrons a oxigen.

Loke i col també han demostrat que agents que estimulen l'alliberació de NO endogen com la bradiquinina, l'amlodipí o el ramipril, disminueixen de forma significativa el consum d'oxigen tissular en el miocardi amb insuficiència cardíaca. Aquest efecte s'atenuava en presència de L-NAME (inhibidor de la NO sintasa), suggerint un paper del NO en la regulació de la respiració mitocondrial.

L'alteració del metabolisme energètic cardíac es considera que és una de les principals causes de MCDI (Kelly i col, 1996). Donat que el cor depèn molt del metabolisme oxidatiu, la disfunció mitocondrial pot tenir un paper primari en aquestes alteracions. De fet s'ha trobat afectació cardíaca en un gran nombre de malalties mitocondrials, bé associades a símptomes neuromusculars o amb menys freqüència

com la principal alteració clínica (Anan i col, 1995).

En el nostre estudi, vam analitzar l'activitat dels enzims de la cadena respiratòria en homogeneïtzat de cor de 17 pacients amb ICC en fase terminal. La troballa principal fou una disminució significativa en l'activitat enzimàtica del complex III mesurada de forma aïllada o conjuntament amb el complex I (I + III), independentment de si s'expressava com mg de proteïna o es corregia per l'activitat de la citratsintasa. Marin-García i col (1994) també va trobar una reducció anormal de l'activitat d'alguns enzims mitocondrials a la MCDI, sent el complex III el que estava més freqüentment disminuït. Altres autors havien trobat prèviament, resultats similars (Buchwald i col, 1990), però aquests estudis no incloïen grups control apropiats. D'altra banda, dos altres estudis mostraven un augment de l'activitat del complex III en la MCDI (Maurer i col, 1993; Bornstein i col, 1998), suggerint algun tipus de mecanisme compensatori mitocondrial a la insuficiència cardíaca. Aquests estudis de tota manera, diferien del nostre en alguns aspectes metodològics, doncs l'activitat del complex III no es mesurava directament, sinó a través de l'activitat dels complexos I+III i II+III, a més alguns pacients no estaven en classe funcional IV de la NYHA.

De tota manera, és probable que depenent del moment en que s'avalua la insuficiència cardíaca hi hagi un augment compensatori en l'activitat enzimàtica i que la disminució sigui un fenomen tardà, com trobem en el nostre estudi.

Podria ser, que la disfunció cardíaca que trobem a les miocardiopaties dilatades, produís una alteració secundària al mtDNA, ja sigui a través d'un augment en la producció de radicals lliures o a través d'altres mecanismes desconeguts. S'han proposat mecanismes similars per explicar algunes malalties neurodegeneratives, aterosclerosi i l'envelliment (Knight i col, 1998).

3.5. DISCUSSIÓ CONJUNTA

Diferents estudis clínics han demostrat que pacients amb insuficiència cardíaca expressen nivells excessius de citoquines en serum (Sasayama i col, 1999). La síndrome de la insuficiència cardíaca engloba però diferents tipus de

cardiopaties. Les miocardiopaties dilatades, les miocardiopaties hipertròfiques o la cardiopatia isquèmica entre altres. Sasayama va desenvolupar models murins d'aquestes patologies. En el model murí de miocarditis, les citocines inflamatòries eren induïdes ràpidament al miocardi i es continuaven expressant durant la fase crònica quan el cor assumia el patró típic de miocardiopatia dilatada. En el model murí en que el ventricle estava sotmès a una sobrecàrrega de pressió, el miocardi primer desenvolupava una hipertròfia adaptativa i les citocines tenien un paper significatiu en aquest procés accelerant el creixement dels miocits i alterant la funció diastòlica. En el model murí de cardiopatia isquèmica, el miocardi no-isquèmic desenvolupava hipertròfia a expenses de les citocines inflamatòries que estaven sintetitzant-se contínuament al miocardi sa. Per tant, alguns aspectes de la insuficiència cardíaca poden ser secundaris a alteracions de la funció i canvis estructurals del ventricle induïts per citocines.

També s'ha demostrat que els nivells de citocines en serum es correlacionen amb la severitat de la ICC. De tota manera, la diana de l'efecte biològic de les citocines sembla més determinat per l'òrgan productor que pels nivells sèrics.

Les citocines proinflamatòries poden modular les funcions cardiovasculars per una varietat de mecanismes. Un d'aquests mecanismes és l'augment de l'activitat de la NOS II al miocit i per tant un augment d'alliberament de NO. NO i cGMP indueixen una resposta contràctil bifàsica concentració-depenent, dosis baixes de NO causen una resposta inotrópica positiva i dosis altes s'associen a inotropisme negatiu (Drexler i col,1999).

L'acció del NO sobre la mitocondria i concretament sobre la cadena respiratòria mitocondrial és encara tema d'estudi, però Cleeter i col (1994) van descobrir que el NO inhibeix de forma reversible la cadena respiratòria a nivell del complexe IV (citocrom C oxidasa). En el nostre estudi no vàrem trobar disminució de l'activitat enzimàtica del complexe IV, però en canvi es va trobar una disminució significativa de l'activitat del complexe III de forma aïllada o conjuntament amb el complexe I (I+III).

Aquesta tesi aporta noves evidències sobre els mecanismes patològics de la ICC. Partint de les citocines proinflamatòries que indueixen l'activació de la NOS II,

creant un excés de NO que podria actuar de forma final a nivell de la cadena respiratòria mitocondrial, traduïnt-se en un efecte inotrópic negatiu sobre el miocit.

4. CONCLUSIONS

1. En el miocardi dels pacients amb MCDI en classe funcional IV, la NOS II s'expressa de forma constant. Aquest fenomen es produeix rarament en cors dilatats d'altres etiologies i mai en el miocardi sa.
2. Aquesta troballa sembla indicar que la NOS II pot tenir un paper específic a la patogènia de la disfunció contràctil en pacients amb MCDI.
3. Els pacients amb MCDI tenien uns nivells de NOx molt superiors als nivells de normalitat del nostre laboratori. Mentre que els nivells de NOx en els pacients amb cardiopatia isquèmica i en els controls era normal. Aquest resultat reforça la primera conclusió i recolza el fet de que la NOS II expressada en excés, sigui la causant d'aquest increment de producció de "NOx".
4. Els nivells de citoquines en sèrum estan augmentats de forma significativa en els pacients amb insuficiència cardíaca comparat amb els controls i els seus valors augmenten a mesura que empitjora la seva classe funcional de la NYHA. Cal destacar que no hi ha diferències en el patró de citoquines segons l'etiologia de la ICC.
5. Als pacients amb MCDI, nivells patològics d'IL-6 es van associar a una fracció d'ejecció més baixa, més incidència de classe funcional III-IV i pitjor pronòstic.
6. Els nivells d'IL-6 elevats a sèrum poden contribuir a lesió miocàrdica crònica (independent de l'activació del sistema renina-angiotensina) i tenir un paper important a la progressió de la malaltia.
7. La IL-6 en sèrum es va identificar durant el seguiment com el predictor independent més important de nous episodis d'ICC, èxitus o necessitat de trasplantament cardíac. És un millor predictor que les neurohormones plasmàtiques o la funció ventricular esquerra. Per tant la IL-6 és un predictor important de mal pronòstic.

8. Aquest estudi també demostra que encara que els nivells de TNF- α , receptors I i II del TNF- α , IL-1 β i el sIL-2R s'associen a més morbiditat durant el seguiment. Aquests eren uns predictors menys importants de mal pronòstic que la IL-6.
9. A la vegada els receptors solubles del TNF- α eren millors predictors d'incidents que el mateix TNF- α .
10. S'ha trobat una disminució de l'activitat del complex III de la cadena respiratòria mitocondrial tant en els pacients amb MCDI com en els pacients amb cardiopatia isquèmica en fase dilatada. El fet de trobar-ho en diferents etiologies d'ICC recolza la hipòtesi de que es tracta d'un fenomen secundari i no d'una malaltia primària de la mitocòndria en la majoria de pacients amb MCDI.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Heme Coordination of NO in NO synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10769-10772.
2. Anan R, Nakagawa M, Miyato M, Higuchi I, Nakao S, Suehara M y cols. Cardiac involvement in mitochondrial disease. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation* 1995; 91:955-961.
3. Anderson JL, Carlquist JF, Lutz JR, i col. HLA A, B and DR typing in idiopathic dilated cardiomyopathy: a search for immune response function. *Am J Cardiol* 1984; 33:1326-30.
4. Archard LC, Bowles EN, Cunningham L, i col. Molecular probes for detection of persisting enterovirus infection of human heart and their prognostic value. *Eur Heart J* 1991; 121 (Suppl D): 56-9.
5. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7:349-60.
6. Arts WFM, Scholte HR, Bogaard JM, Kerrebijn KE, Luyt-Houwen IEM. NADH-CoQ reductase deficient myopathy: Successful treatment with riboflavin. *Lancet* 1983; ii:581-582.
7. Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (21):10089-93.
8. Backwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10:299-303.
9. Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem* 1993; 268:21120-21129.
10. Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, i col. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:27580-88.

11. Bandatelova T, Brouet L, Bartsch H, Sugimura T, Esumi H and Ohshima H. Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. *Apmis* 1993; 101:330-336.
12. Bardosi A, Creutzfeldt W, DiMauro S y cols. Myo-neuro-, gastrointestinal encephalopathy (MNGIE syndrome) due to partial deficiency cytochrome-c-oxidase. A new mitochondrial multisystem disorder. *Acta Neuropathol* 1987; 74:248-258.
13. Becherel PA, Mossalayi MD, Ouaz F, Le Goff L, Dugas B, Paul-Eugene N, Frances C, Chosidow O, Kilchherr E, Guillosson JJ, i col. Involvement of cyclic AMP and nitric oxide in immunoglobulin E-dependent activation of FC ϵ RII/CD23⁺ normal human keratinocytes. *J Clin Invest* 1994; 93 (5):2275-9.
14. Benedict CR. Neurohumoral aspects of heart failure. *Cardiol Clin* 1994; 12:9-23.
15. Berko BA, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1987; 316:1186-91.
16. Bolte HD, Schultheiss HP. Immunological results in myocardial disease. *Postgr Med J* 1978; 54:500-503.
17. Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995; 41:904-7.
18. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:682-685.
19. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351:714-718.
20. Buchwalow I, Shulze W, Karczewski P et al. Inducible nitric oxide synthase in the myocard. *Molecular and Cellular Biochemistry*,2001; 217:73-82.
21. Byrne E, Trounce I. Oxygen electrode studies with human skeletal muscle mitochondria in vitro. A re-appraisal. *J Neurol Sci* 1985; 69:319-333.

22. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, i col. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992; 85:1734-42.
23. Cardellach F, Galofre J, Grau JM, Casademont J, Hoek JB, Rubin E, Urbano-Márquez A. Oxidative metabolism in muscle mitochondria from patients with chronic alcoholism. *An Neurol* 1992; 31:515-518.
24. Carter LF, Rubin SA. The molecular and cellular biology of heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1994; 9:264-71.
25. Casademont J, Miró O. Electron Transport Chain Defects in Heart Failure. *Heart Failure Reviews*, 2002;7: 131-139.
26. Cavero PG, Miller WL, Heublein DM, i col. Endothelium in experimental congestive heart failure in the anesthetized dog. *Am J Physiol* 1990; 259:F312-17.
27. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, i col. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989; 80:564-72.
28. Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Williamson JR, McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992; 41:552-56.
29. Champe PC, Harvey RA. Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry. JB Lippincott Co, Filadelfia 1987.
30. Charles IG, Palmer RMJ, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW and Moncada S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding and inducible nitric oxide synthase from the human chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11419-11423.
31. Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27(1):154-8.

32. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992; 176(2):599-604.
33. Dansky HM, Buttrick PM. Unraveling the genetic basis of dilated cardiomyopathy. *Heart Failure* 1994; 10:5-10.
34. De Belder AJ, Radomski MW, WHY HJF, i col. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 1993; 341:84-85.
35. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994; 331:1564-75.
36. Deswal A, Petersen N, Feldman A. et al. Cytokines and cytokine receptors in Advanced Heart Failure. An Analysis of the Cytokine database from the Vesnarinone Trial (Vest). *Circulation*, 2001;103:2055-2059.
37. Diaz RA, Obasohan A and Oakley CM. Prediction of outcome in dilated cardiomyopathy. *Br Heart J* 1987; 58:393.
38. DiMauro S, Nicholson JF, Hays AP, Eastwood AB, Papadimitriou A, Koenigsberger R, DeVivo DC. Benign infantile mitochondrial myopathy due to reversible cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* 1983; 14:226-234.
39. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10):4214-8.
40. Drexler H, Kästner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuß G. Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1988; 32:955-63.
41. Durand R. L'assemblage des mitochondries. *Recherche* 1986; 17:162-171.
42. Dzau VJ, Packer M, Lilly LS, i col. Prostaglandins in severe heart failure: relation to activation of the renin-angiotensin system and hyponatremia. *N Engl J Med* 1984;310:347-52.
43. Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. Cytokine-

- treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18):9553-8.
44. Ferrans VJ. Pathologic anatomy of the dilated cardiomyopathies. *Am J Cardiol* 1989; 64:9C.
 45. Figarella-Branger D, Pellisier JF, Scheiner C, Wernert F, Desnuelle C. Defects of the mitochondrial respiratory chain complexes in three pediatric cases with hypotonia and cardiac involvement. *J Neurol Sci* 1992; 108:105-113.
 46. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-9.
 47. Föstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frölich JC. Selective attenuation of endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans coronary arteries. *Cir Res* 1988; 62: 185-190.
 48. Föstermann U, Schmidt HW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991; 42:1849-1857.
 49. Fukuchi M, Hussain S, Giaid A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure. Their relation to lesion site and β -Adrenergic receptor therapy. *Circulation* 1998; 98:132-139.
 50. Funakoshi H, Kubota T, Machida Y. Involvement of inducible nitric oxide synthase in cardiac dysfunction with tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:2159-2166.
 51. Geller DA, de Vera ME, Russell DA, Shapiro RA, Nussler AK, Simmons RL, Billiar TR. A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis. *J Immunol* 1995; 155 (10):4890-8.
 52. Geroulanos S, Schilling J, Cakmakci M, Jung HH, Largiader F. Inhibition of NO synthesis in septic shock. *The Lancet* 1992; 339:435.

53. Gillum RF. Idiopathic cardiomyopathy in the United States 1970-1982. *Am Heart J* 1986; 111:752-5.
54. Gillis S. T cell-derived lymphokines. *Fundamental Immunology* 1989; 621-638.
55. Giovanelli J, Campos KL, Kaufman S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7091-7095.
56. Glausser MP, Zanetti G, Baumgrtner JD, Cohen J. Septic shock: Pathogenesis. *The Lancet* 1991; 338: 732-736.
57. Greenberg B, Roden K, Bernes PJ. Endothelium-dependent relaxation of human pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1987; 252:H434-8.
58. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:707-36.
59. Gross SS and Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992; 267:25722-25729.
60. Habib F, Dutka D, Crosman D, Oakley CM, Cleland JGF. Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: another failed counter-regulatory vasodilator mechanisms? *Lancet* 1994; 344:371-73.
61. Hall RE, Henriksson KG, Lewis SF, Haller RG, Kennaway NG. Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest* 1993; 92:2660-2666.
62. Haller RG, Lewis SF, Estabrook RW, DiMauro S, Servidei S, Foster DW. Exercise intolerance, lactic acidosis, and abnormal cardiopulmonary regulation in exercise associated with adult skeletal muscle cytochrome c oxidase deficiency. *J Clin Invest* 1980; 84:155-161.
63. Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system *Ann Rev Biochem* 1985; 54:1015-1069.
64. Hattori K, Ogawa T, Kondo T y cols. Cardiomyopathy with mitochondrial DNA

- mutations. *Am Heart J* 1991; 122:866-869.
65. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; 93(6):1087-94.
66. Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *Am J Physiol* 1993; 265(3 Pt 2):H828-33.
67. Hein S, Beund T, Munkel B, i col. Contractile and cytoskeleton protein synthesis is disturbed at the receptor level in failing human myocardium [Abstract]. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24(Suppl I):228.
68. Herskowitz A, Neumann DA, Ansari AA. Concepts of autoimmunity applied to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1385-8.
69. Herzum M, Maisch B. Anti-viral and anti-myocyte antibodies in experimental myocarditis. *Springer Semin Immunopathol* 1989; 11:69-76.
70. Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991; 266:22789-22791.
71. Hiroe M, Hirata Y, Fujita N, i col. Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1991; 68:1114-15.
72. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25:171-191.
73. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, i col. Endothelin induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991; 69:209-15.
74. James TN. Myocarditis and cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1983; 308:39-41.
75. Jarreta D, Orús J, A Barrientos i col. Mitochondrial Function in Heart Muscle

- from patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, 2000;45:860-865.
76. Johnson MA, Turnbull DM, Dick DJ, Sherratt HSA. A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol Sci* 1983; 60:31-53.
77. Juilliere Y, Danchin N, Briancon S, i col. Dilated cardiomyopathy: Long-term follow-up and predictors of survival. *Int J Cardiol* 1988; 21:269.
78. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of NaN_3 and NH_2OH . *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphoryl Res* 1977; 3:23-35.
79. Katz SD, Rao R, Berman JW, i col. Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation.
80. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79:363-380.
81. Kelly DP, Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 1994;330:913-9.
82. Kennaway NG. Defects in the cytochrome bc, in mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr* 1988; 20: 325-352.
83. Keog AM, Baron DW, Hickie JB. Prognostic guides in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy assessed for cardiac transplantation. *Am J Cardiol* 1990; 65:903.
84. Keren A, Gottlieb S, Tzivoni D, i col. Mildly dilated congestive cardiomyopathy. Use of prospective diagnostic criteria and description of the clinical course without heart transplantation. *Circulation* 1990; 81: 506.
85. Kilbourn RG and Belloni P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon γ in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1

- or endotoxin. *J Natl Canc Inst* 1990; 82:772-776.
86. Klein R, Maisch B, Kochsiek K, i col. Demonstration of organ specific antibodies against heart mitochondria (anti-M7) in sera from patients with some forms of heart diseases. *Clin Exp Immunol* 1984; 58:283-92.
87. Kloner RA, Hale S, Alker K, Rezkalla S. The effects of acute and chronic cocaine use on the heart. *Circulation* 1992; 85:407-419.
88. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372(6506):546-8.
89. Konstam MA, Rousseau MF, Kronenberg MW, i col. Effects of the angiotensin converting-enzyme inhibitor, enalapril, on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. *Circulation* 1992; 86:431-8.
90. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, i col. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 1991; 84:1589-96.
91. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, i col. Chronic inflammation in dilated cardiomyopathy. *Heart Failure* 1994; 9:231-45.
92. Laragh JH. Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. *N Engl J Med* 1985; 313:1330-40.
93. Lefer AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increased neutrophil adherence to coronary artery endothelium. *Atheroscler Thromb* 1993; 13:771-776.
94. Levine B, Kulman J, Mayer L, i col. Elevated circulating levels at tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323:236-41.
95. Li YY, Hengstenberg C, Maisch B. Whole mitochondrial genome amplification reveals basal level multiple deletions in mtDNA of patients with dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 210:211-218.
96. Li YY, Zhang JN, Ma WZ. Studies on the genetic susceptibility to dilated cardiomyopathy. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* 1993; 32:25-7.

97. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Soluble interleukin-2 receptor levels in patients with dilated cardiomyopathy. Correlation with disease severity and cardiac autoantibodies. *Circulation* 1995; 91:631-34.
98. Luscher TF, Cooke JP, Houston DS, i col. Endothelium-dependent relaxation in human arteries. *Mayo Clin Proc* 1987, 62:601-6.
99. Luscher TF, Diederich D, Siebennan R, i col. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 1986; 315:1046-51.
100. Maisch B. Immunologic regulator and effector functions in perimyocarditis, postmyocarditic heart muscle disease and dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 1986; 81(Suppl 1):217-41.
101. Maisch B, Berg PA, Kochsiek K. Immunological parameters in patients with congestive cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 1980; 75:221-2.
102. Maisch B, Deeg P, Liebau G, Kochsiek K. Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1983; 52:1072-8.
103. Maisch B, Drude L, Hengstenberg C, i col. Are antisarcolemmal (ASAs) and antimyolemmal antibodies (AMLAs) "natural" antibodies? *Basic Res Cardiol* 1991; 86 (Suppl 3):101-14.
104. Maisch B, Hengstenberg C, Bethge C, i col. Immunological factors in dilated cardiomyopathy. *Heart Failure* 1994; 9:246-59.
105. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM i col. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161-167.
106. Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992; 358:676-8.
107. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Carta M, Dubois R, Gu J, Goldenthal MJ. Mitochondrial dysfunction in a case of fatal infantile cardiomyopathy. *J Inher Metab Dis* 1994; 17:758-767.

108. Marín-García J, Goldenthal J. Cardiomyopathy and abnormal mitochondrial function. *Cardiovasc Res* 1994; 28:456-463.
109. Marin-García J, Goldenthal M. Understanding the Impact of Mitochondrial Defects ub Cardiovascular disease: A Review. *Journal of Cardiac Failure*, 2002;5: 347-361.
110. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 1991; 43:109-42.
111. Moreadith RW, Batshaw ML, Ohnishi T, Kerr D, Knox B, Lackson D, Hruban R, Olson J, Reynafarje B, Lehninger AL. Deficiency in iron-sulfur clusters of mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in an infant with congenital lactic acidosis. *J Clin Invest* 1984; 74:685-697.
112. Morgan-Hugues JA, Hayes DJ, Clark JB. Mitochondrial myopathies. En: Serratrice G, Cros D, Desnuell C y cols. (Eds.). *Neuromuscular diseases*. Raven Press, New York 1984; 79-85.
113. Morgan-Hugues JA, Schapira AHV, Cooper JM, Clark JB. Molecular defects of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr* 1988; 20:365-382.
114. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268:12231-34.
115. Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopahty: time to revisit virus. *Heart Failure* 1994; 9:218-26.
116. Matsuri A, Shioi T, Yamada T, i col. Vesnarinone, a new inotropic agent, inhibits cytokine production by stimulated human blood from patients with heart failure. *Circulation* 1994; 89(Suppl 3):955-8.
117. Mayer B, John M and Böhme E. Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 1990; 277:215-219.
118. Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Böhme E.

- Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett* 1991; 288:187-191.
119. Michels W, Moll PP, Miller PA, i col. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992; 326:77-82.
120. Miller W, Redfield M, Burnett JC Jr. Integrated cardiac, renal and endocrine actions of endothelin. *J Clin Invest* 1989; 83:317-20.
121. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993; 233(1):119-25.
122. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
123. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27):p2002-12.
124. Moore WM, Weber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG. L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 1994; 37:3886-3888.
125. Moraves CS, Reynolds EE, Stewart RW, i col. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:14-18.
126. Morian AJ, Roberts R. Molecular basis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Texas Heart Inst J* 1994; 21:6-15.
127. Murphy ME, Noack E. Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol* 1994; 233:240-50.
128. Nakaoka H, Imataka K, Amano M, i col. Plasma levels of atrial natriuretic factor in patients with congestive heart failure [Letter]. *N Engl J Med* 1985; 313:892-93.
129. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*

- 1992; 6(12):3051-64.
130. Nattilan AJ, Pratt RJ, Eldridge CS, i col. Angiotensin II induces c-fos expression in smooth muscle via transcriptional control. *Hypertension* 1989; 13:706-11.
131. Natural history of dilated cardiomyopathy (editorial). *Lancet* 1986; 1:248.
132. Needleman P, Bronson SD, Wyche A, i col. Cardiac and renal prostaglandin I₂: biosynthesis and biological effects in isolated perfused rabbit tissue. *J Clin Invest* 1978; 61:839-49.
133. Nicod P, Waeber B, Bussien JP, i col. Acute hemodynamic effect of a vascular antagonist of vasopressin in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1985, 55:1043-7.
134. Nichol CA, Smith GK, Duch DS. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:729-764.
135. Nicholson S, Bonecini-Almeida M da G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996; 183(5):2293-302.
136. Obermayer U, Scheidler J, Maisch B. Antibodies against micro- and intermediate filaments in carditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1987; 8 (Suppl J): 181-6.
137. Oliver JA, Sciacca R, Pinto J, i col. Participation of the prostaglandins in the control of renal blood flow during acute reduction of cardiac output in the dog. *J Clin Invest* 1981; 67:229-37.
138. Orús J, Heras M, Morales-Ruiz M, i col. Nitric oxide synthase II mRNA expression in cardiac tissue of patients with heart failure undergoing cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2000;19:139-144.
139. Orús J, Roig E, Filella X, i col. Prognostic value of serum cytokines in patients with congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant*, 2000;19:419-425.
140. Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S y cols. Multiple mitochondrial DNA deletions

- exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:830-836.
141. Packer R, Bergler-Klein J, Globits S, i col. Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1993; 71:1293-9.
142. Packer M, Lee WH, Kessler PD, i col. Role of neurohormonal mechanisms in determining survival in patients with severe chronic heart failure. *Circulation* 1987; 75 (suppl IV); 80-92.
143. Papadimitriou A, Neustein HB, DiMauro S, Stanton R, Bresolin N. Histocticoidic cardiomyopathy in infancy: Deficiency of reducible cytochrome b in heart mitochondria. *Pediatr Res* 1984; 18:1023-1028.
144. Parmley WW. Congestive heart failure. In: Messerli FH, ed. *Cardiovascular drug therapy*. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 12-15.
145. Reichmann H, Angelini C. Single muscle fibre analyses in 2 brothers with succinate dehydrogenase deficiency. *Eur Neurol* 1994; 34:95-98.
146. Reichman H, Rohkamm R, Zeviani M, Servidei S, Richer K, DiMauro S. Mitochondrial myopathy due to complex III deficiency with normal reducible cytochrome b concentration. *Arch Neurol* 1986; 43:957-961.
147. Reiling N, Ulmer AJ, Duchrow M, Ernst M, Flad HD, Hauschildt S. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur J Immunol* 1994; 24 (8):1941-4.
148. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44:672-3.
149. Reyes MP, Lerner AM. Coxsackie virus myocarditis -with special reference to acute and chronic effects. *Prog Cardiovasc Dis* 1985; 27:373-94.
150. Roberts WC, Siegel RJ, McManus BM. Idiopathic dilated cardiomyopathy: analysis of 152 necropsy patients. *Am J Cardiol* 1987; 60:1340-55.
151. Robinson BH. Lactic acidemia. En: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D.

- Valle (Eds.). The metabolic basis of the inherited disease. New York McGraw-Hill 1989;869-888.
152. Roig E, Orús J, Paré C i col. Serum interleukin-6 in Congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *American J Cardiol* 1998;688-690.
153. Romeo F, Pelliccia F, Cianfrocca C, i col. Determinants of end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy: A multivariate analysis of 104 patients. *Clin Cardiol* 1989; 12:387.
154. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228:35-51.
155. Salerno JC, Harris DE, Irizarry K, Patel B, Morales AJ, Smith SM, Martasek P, Roman J, Masters BS, Jones CL, Weissman BA, Lane P, Liu Q, Gross SS. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272(47):29769-77.
156. Sasayama S, Matsumori A, Kihara Y. New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure. *Cardiovascular Research* 1999;42:557-564.
157. Schaper J, Frader R, Hein S, i col. Impairment of myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991; 83:504-14.
158. Shenker Y, Sider RS, Ostafin EA, i col. Plasma levels of immunoreactive atrial natriuretic factor in healthy subjects and in patients with edema. *J Clin Invest* 1985; 76:1684-7.
159. Schotland DL, DiMauro S, Bonilla E, Scarpa A, Lee CP. Neuromuscular disorder associated with a defect in mitochondrial energy supply. *Arch Neurol* 1976; 33:475-479.
160. Schultheiss HP. Disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy due to autoimmunological mechanisms. *Circulation* 1983; 87 (Suppl 5): IV43-8.

161. Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992; 105(3):575-80.
162. Schulze K, Becker BF, Schauer R, i col. Antibodies to ADP-ATP carrier –an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy –impair cardiac function. *Circulation* 1990; 81:959-69.
163. Schwaiger A, Umlauf F, Weyrer K i col. Detection of enteroviral ribonucleic acid in myocardial biopsies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by polymerase chain reaction. *Am Heart J* 1993; 126:406-10.
164. Sengers RCA, Fisher JC, Trijbels JMF, Ruttenbeek W, Stadhouders AM, Ter Laak HJ, Jaspar HH. A mitochondrial myopathy with a defective respiratory chain and carnitine deficiency. *Eur J Pediatr* 1983; 140:332-337.
165. Silver MA. Anatomy of the failing heart in dilated cardiomyopathy. In: Engelmeier RS, O'Connell JB, eds. *Drug therapy in dilated cardiomyopathy and myocarditis*. New York: Marcel Dekker, 1988: 1-12.
166. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-active forms. *Science* 1992; 258:1898-902.
167. Smyth DPL, Lake BD, McDermond J, Wilson J. Inborn error of carnitine (carnitine deficiency) in man. *Lancet* 1975; i:1198-1199.
168. Stein B, Eschenhagen T, Rüdiger J, Scholz H, Förstermann U, Gath I. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1988; 32:1179-86.
169. Stevenson LW, Fowler MB, Schroeder JS, i col. Poor survival of patients with idiopathic cardiomyopathy considered too well for transplantation. *Am J Med* 1987; 83:871.
170. Stewart DJ, Cernacek P, Costello KB, i col. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992; 85:510-17.

171. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N^w-Hydroxy-L-Arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991a; 266:6259-6263.
172. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991b; 88:7773-7777.
173. Stuehr DJ. Structure-Function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:339-59.
174. Suomalainen A, Paetau A, Leiononen H, Majander A, Peltonen L, Somer H. Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 1992; 340:1319-1320.
175. Thiemermann C, Vane J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduce the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1990; 182:591-595.
176. Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Forstermann U. Identification of an endothelial-like type III NO synthase in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266(1Pt 1): C22-8.
177. Tsujino M, Hirata Y, Imai T i col. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin-1beta in cultured rat cardiocytes. *Circulation* 1994; 90:375-83.
178. Twort CH, Van Breemen C. Cyclic GMP enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Cir Res* 1988; 62:961-964.
179. Urata H, Healy B, Stewart RW, i col. Angiotensin II receptors in normal and failing human hearts. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:54-66.
180. Urbano Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont LI, Rubin E. The effects of alcoholism on cardiac and skeletal muscle. *N Engl J Med* 1989; 320:409-15.
181. Vallance P, Patton S, Bhagat K, MacAllister R, Radomski M, Moncada S, Malinski T. Direct measurement of nitric oxide in human beings. *The Lancet*

- 1995; 346:153-4.
182. Wallace DC, Singh G, Lott MT y cols. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242:1427-1430.
183. Watkins IJ, Burton JA, Haber E, i col. The renin-aldosterone system in congestive heart failure in conscious dogs. *J Clin Invest* 1976; 57:1606-17.
184. Wei C, Lerman A, Rodeheffer RJ, i col. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89:1580-6.
185. Wheeler MA, Smith SD, García-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest* 1997; 99(1):110-6.
186. Winlaw DS, Symthe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS. Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet* 1994; 344:373-74.
187. Yamane Y. Plasma ADH level in patients with chronic congestive heart failure. *Jpn Circ J* 1968; 32:745-59.
188. Zelis R, Mason DT, Braunwald L. A comparison of the effects of vasodilator stimuli on peripheral vascular resistance vessels in normal subjects and in patients with congestive heart failure. *J Clin Invest* 1968; 47:960-70.
189. Zeviani M, Nonaka I, Bonilla E y cols. Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction caused by cytochrome c oxidase deficiency: Immunological studies in a new patient. *An Neurol* 1985; 17:414-417.
190. Zeviani M, Van Dyke DH, Servidei S y cols. Myopathy and fatal cardiopathy due to cytochrome c oxidative deficiency. *Arch Neurol* 1986; 43:1198-1202.
191. Zusman RM, Keiser HR. Prostaglandin biosynthesis by rabbit renomedullary interstitial cells in culture: stimulation by angiotensin II, bradykinin and arginine vasopressin. *J Clin Invest* 1977; 60: 215-23.

6. ARTICLES PUBLICATS