

Apoptosis y efecto cardiovascular

J. Fernández-Solà y G. García-Segarra

Servicio de Medicina Interna. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universitat de Barcelona. España.

Introducción. Concepto de apoptosis

Apoptosis es el nombre que Kerr et al propusieron en 1972 para denominar a los cambios morfológicos específicos que sufren las células, con condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, formación de vacuolas y cambios citoplasmáticos asociados, que conllevan un proceso de muerte celular programada¹. La apoptosis supone en último término la activación de enzimas proteolíticas endocelulares (endonucleasas, proteasas, caspasas) con gasto energético celular. Todo ello provoca una extensa fragmentación por proteólisis del ADN cromosómico y la formación de oligofragmentos de ADN, denominados nucleosomas o cuerpos apoptóticos, que son finalmente expulsados de la célula por exocitosis. Etimológicamente, apoptosis (*appto-toe-sis*) hace referencia al progresivo descenso o desprendimiento celular que sufren los nucleosomas, similar a la “caída de las hojas de un árbol”, que se desprenden desde la célula al exterior para ser posteriormente fagocitados por macrófagos u otras células vecinas sin mediar reacción inflamatoria.

La apoptosis es un término que, en los últimos años, ha pasado de ser un completo desconocido a ser implicado en la mayoría de los procesos fisiopatológicos de daño celular^{2,3}. Su relevancia actual queda patente al concederse el premio Nobel de Medicina del año 2002 a los investigadores que sentaron las bases de la apoptosis en el modelo experimental del nematodo *Caenorhabditis elegans*⁴. De hecho, el concepto global de muerte celular programada no es

nuevo, ya que fue sugerido por primera vez por Vogt en 1842, aunque sin demasiada aceptación inicial por la comunidad científica. Posteriormente, este concepto ha sido recuperado, potenciado y ha sufrido una evolución conceptual importante.

El concepto clásico de muerte celular fue establecido por Virchow a mediados del siglo XIX al definir la necrosis. Con posterioridad se añadieron otras variantes morfológicas de muerte celular, como la cromatólisis propuesta por Walter Flemming en el mismo siglo XIX y, posteriormente, la oncosis⁵ o la misma apoptosis¹. De hecho, se observó que la capacidad de programar la muerte celular es una propiedad fundamental de las células animales⁶. Aunque inicialmente la apoptosis se describió y aplicó al campo de la embriología como una forma de controlar y modular el desarrollo celular⁷, con posterioridad se aceptó como un proceso más amplio que entraría en la idea de “muerte celular programada” o también en el concepto de “autólisis o suicidio celular”. De hecho, la apoptosis incide en los procesos de control del crecimiento, proliferación, atrofia e hipertrofia celulares e interacciona en algunos procesos de inflamación y desarrollo tumoral. La contraposición inicial entre apoptosis y necrosis debe superarse ya que, en realidad, son procesos de alguna forma complementarios⁸. Actualmente, se considera la necrosis como el conjunto de cambios degradativos en los que termina cualquier tipo de muerte celular. Es decir, la necrosis es la consecuencia de la muerte celular (fig. 1). Para llegar a la muerte celular se consideran dos tipos de vías:

- La oncosis, en que la célula permeabiliza la membrana celular, se edematiza, se hincha y estalla. Conlleva un proceso inflamatorio asociado.

- La apoptosis, en que se produce una contracción y fragmentación celular y del ADN nuclear, sin respuesta inflamatoria.

Correspondencia: Dr. J. Fernández-Solà.
Travessera de Les Corts, 274, A, 6.º 2.º.
08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: Jfernand@clinic.ub.es

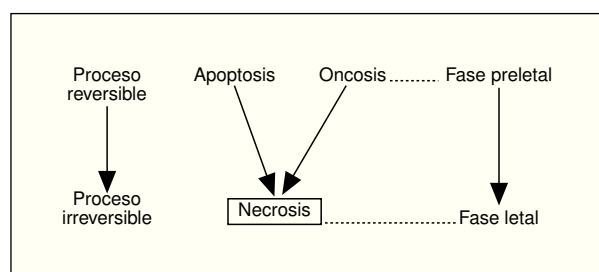


Figura 1. Interrelación entre los procesos de destrucción celular: apoptosis, oncosis y necrosis.

En la tabla 1 se resumen los principales hechos diferenciales entre apoptosis y necrosis.

Mecanismos generales de apoptosis

El proceso fisiopatológico de apoptosis es complejo pero ordenado y bien regulado, con numerosas variantes y sistemas de activación, control y contrarregulación, con genes específicos reguladores para cada uno de estos procesos. En la apoptosis se han definido cuatro fases bien diferenciadas: a) iniciación; b) activación intra o extracelular; c) ejecución, y d) resolución.

1. La iniciación puede ponerse en marcha por estímulos intra o extracelulares. Entre los primeros destaca la activación de proteínas de la familia BCL-2, especialmente el BAX, que altera la integridad estructural y funcional de la mitocondria, libera citocromo c al citoplasma, activa la proteasa APAF-1 y abre el poro de permeabilidad mitocondrial (MPP). A la vez, también se activan otras proteínas de la familia BCL-2 que tienen un efecto contrario, antiapoptótico. El resultado final del proceso dependerá de la intensidad del estímulo inicial y del equilibrio entre los factores pro y antiapoptóticos. También puede ser muy variable la velocidad en que se desarrolla todo el proceso.

Tabla 1. Principales diferencias entre los procesos de apoptosis y necrosis celular

	Apoptosis	Necrosis
Condensación nuclear	Sí	No
Respuesta inflamatoria	No	Sí
Fagocitosis	No	Posible
Edema celular	No	Sí
Volumen celular	Disminuido	Aumentado
Rotura del ADN	Ordenada	Al azar
Lisis y liberación de material citoplasmático	No	Sí
Membrana celular	Fragmentada	Lisada
Gasto energético	Sí	No
Activación de proteasas	Sí	No
Capacidad de regresión	Parcial	No
Cronología de los cambios	Lenta	Rápida

2. La activación puede ser extra o intracelular. Entre los estímulos de activación extracelular de apoptosis se ha identificado: a) el TNF u otras citocinas, que actúan a través de los receptores de membrana acoplados al Fas y su ligando (Fas-L) y activa las proteínas del denominado *death domain* (TRADD, FADD y FLICE entre otras); b) factores tróficos, nutricionales, hormonales o vasoactivos locales, como la angiotensina, que actúan a través de receptores específicos de membrana celular (receptores acoplados a proteínas G), e interaccionan con las proteínas BCL-2. Esta vía puede activar también el factor nuclear kappa-beta (NF- κ B); c) factores que actúan directamente sobre el ADN celular, como las radiaciones ionizantes, algunas toxinas o fármacos. En este caso, la apoptosis se activa a través del factor inductor P-53 mediante la vía esfingomielina-ceramida; d) alteración mitocondrial directa, mediante alteración del transporte de electrones, liberación de citocromo c o alteración del potencial oxidativo. Estos mecanismos activan los poros de permeabilidad mitocondrial (MPP) y finalmente las caspasas; e) alteraciones del anclaje celular, por afección de las integrinas, con rápida desestructuración y convolución celular. También se puede producir por lesiones directas sobre la membrana celular, como la que produce la granzima B, que se introduce directamente dentro de la célula y activa la procaspasa 3.

La activación intracelular de la apoptosis se produce a partir de las proteínas ICE del *death domain* o la proteasa APAF-1, que activan el MPP y a las caspasas mitocondriales. Existe una gran diversidad de caspasas, mitocondriales numeradas de la 1 a la 9, con dos vías diferenciadas de activación hasta un complejo de activación final común. La activación de las caspasas se considera actualmente el punto clave y sin retorno a partir del cual ya se activa definitivamente la apoptosis, sin posibilidad de contrarregulación posterior.

3. La ejecución de la apoptosis se produce porque las caspasas activadas u otros factores proapoptóticos, como los BAX, los radicales libres oxidantes "ROS" o la ceramida estimulan la activación de segundos mensajeros intracelulares como el calcio intracitosólico. La liberación de calcio desde los depósitos en el retículo endoplásmico eleva la concentración de calcio intracitosólico $[Ca^{2+}]_{ic}$ y activa a su vez las enzimas citosólicas dependientes de calcio (endonucleasas y proteasas). Las endonucleasas fragmentan el ADN y las proteasas dañan el citoesqueleto, lo que produce finalmente rotura del ADN y desestructuración de la citoarquitectura celular, con arrugamiento y convolución celular.

4. La resolución de la apoptosis se produce también por cambios de la composición de la membrana celular; alteración de los fosfolípidos con rotura de membrana y formación de los denominados "cuerpos apoptóticos". Estos cuerpos apoptóticos son específicos de este proceso de apoptosis celular y se pueden identificar morfológicamente mediante microscopía electrónica. Resultan de la fragmentación nuclear y celular y son finalmente excretados al exterior de la célula. Con posterioridad son captados por los macrófagos adyacentes y fagocitados, impidiendo así una respuesta inflamatoria.

Todas estas fases están sometidas a mecanismos específicos o inespecíficos de control de regulación (inactivación de Fas o caspasas, formación de dímeros apoptóticos o dímeros proapoptóticos, activación de factores transcripcionales) que pueden potenciar o suprimir este proceso³.

Papel de la apoptosis en las enfermedades cardiovasculares

Al igual que ha sucedido en otros campos de la medicina, en los últimos años la apoptosis ha sido implicada de manera progresiva en la patogenia de numerosas enfermedades cardiovasculares. Existen excelentes revisiones de conjunto en este campo⁹⁻¹³.

Partiendo de las células del sistema cardiovascular que sufren directamente la apoptosis, cabría diferenciar tres grandes grupos de enfermedades:

1. El cardiomiocito, dando lugar a diferentes miocardiopatías.

2. La célula muscular lisa vascular (CMLV), con implicación de vasos coronarios y las arterias y arteriolas de la circulación periférica. Está afección repercutirá en la presentación de hipertensión arterial (HTA), cardiopatía isquémica y arteriopatía periférica.

3. La célula endotelial, implicada junto con la CMLV en los procesos de arteriosclerosis o en la formación de aneurismas vasculares.

En la tabla 2 se describen las principales enfermedades cardiovasculares en las que se ha implicado el papel de la apoptosis. El estudio de la apoptosis en las enfermedades cardiovasculares es complejo debido al bajo recambio celular de las células implicadas y la relativa rapidez con que se desarrolla el proceso, lo que lo hace, en ocasiones, indetectable. Para la detección de apoptosis se pueden emplear diversas técnicas que identifican la presencia de fragmentación internuclear del ADN y la formación de cuerpos oligonucleosomales:

1. Morfológicamente, mediante estudio con microscopía electrónica de las células, con identificación de los cuerpos apoptóticos o de las características celulares sugestivas de la apoptosis.

Tabla 2. Principales enfermedades cardiovasculares en las que se ha implicado el papel de la apoptosis según la/s célula/s efectora/s implicada/s

Apoptosis de cardiomiocitos

Miocardiopatía dilatada
Hipertrofia miocárdica
Miocarditis
Insuficiencia cardíaca (fases avanzadas)
Rechazo de corazón trasplantado
Corazón hibernado
Postoperatorio de cirugía cardíaca
Síndrome de preexcitación o bloqueo cardíaco
Envejecimiento cardíaco

Apoptosis de célula muscular lisa vascular

Hipertensión arterial esencial
Cardiopatía isquémica
Reestenosis vascular tras angioplastia
Remodelado vascular
Vasculitis y trombosis vascular
Accidente cerebrovascular agudo

Apoptosis de endotelio, macrófagos y/o célula muscular lisa vascular

Cardiopatía isquémica
Arteriosclerosis
Inestabilidad de placas de ateroma
Síndrome de disfunción endotelial
Hipertensión pulmonar primaria

Apoptosis de células embrionarias

Alteraciones del sistema de conducción
Persistencia de *ductus arteriosus*
Valvulopatías
Miocardiopatías hereditarias
Dismorfogénesis cardíaca

2. Mediante técnicas inmunohistoquímicas como el TUNEL (*deoxyribonucleotidil-transferase-mediatedUTP-biotin nick-end labeling*), o su variante ISEL (*in situ nick translation*), que detectan presencia de fragmentación de ADN¹⁴. Se consideran técnicas sensibles pero no muy específicas, ya que células con un elevado índice de transcripción genética pueden dar falsos positivos. Igualmente, se pueden realizar tinciones para factores proapoptóticos, como el BAX, o antiapoptóticos, como el BCL-2 (fig. 2).

3. Mediante estudio electroforético en gel de las cadenas de ADN, para detectar una posible fragmentación. Se consideran técnicas más específicas.

4. En los últimos años se están desarrollando procesos no invasivos de detección de apoptosis por técnicas de imagen mediante ligandos isotópicos con anexina V¹⁵, cuya implementación no ha llegado aún a nuestro medio.

Apoptosis en la cardiopatía isquémica

En las células cardíacas sometidas a isquemia se pueden desencadenar procesos tanto de necrosis como de apoptosis. El significado y los mecanis-

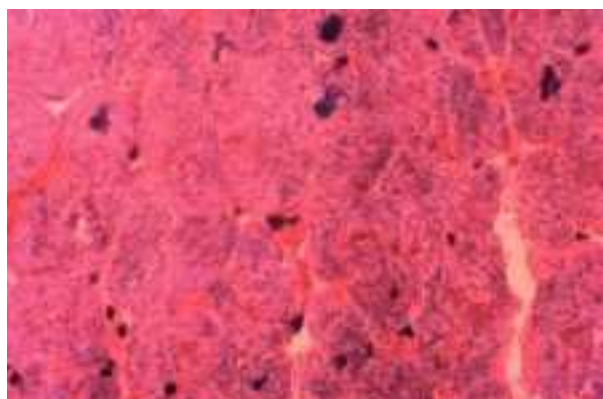


Figura 2. Tinción inmunohistoquímica con el factor antiapoptótico BCL-2 en el miocardio de un paciente afectado de miocardiopatía dilatada. Se aprecia una intensa captación del reactivo en el citoplasma, el endotelio y el intersticio. Así mismo, se observan núcleos apoptóticos desestructurados de gran tamaño y con intensa captación de reactivo (parte superior), comparados con núcleos de tamaño y aspecto normal (parte inferior).

mos moleculares de la apoptosis inducida por isquemia son muy diferentes según el tipo celular implicado (endotelio, CMLV o miocardio) y también según cada proceso (isquemia aguda o crónica, arteriosclerosis primaria, arteriosclerosis del injerto coronario, reestenosis y arteriopatías del trasplante cardíaco)¹⁶.

La isquemia aguda produce, en las zonas centrales miocárdicas más afectadas, un claro fenómeno de necrosis celular. En esta área necrótica central, la apoptosis desempeña un papel poco relevante. Sin embargo, en las zonas periféricas, que reciben un menor grado de lesión isquémica, las llamadas “zonas umbral” pueden desarrollar con frecuencia apoptosis. Su grado depende de la coexistencia de otros factores asociados. En el infarto agudo de miocardio se ha objetivado un incremento de apoptosis en las zonas preriféricas a las recientemente sometidas a isquemia miocárdica¹⁷, y que aún son viables. Es destacable que la reperusión del área isquémica se asocia a apoptosis, probablemente por la elevación brusca de radicales libres y de concentración de [Ca]²⁺ i.c. Por ello, se cree que el control de la apoptosis en la zona de reperusión es importante y posible, ya que podría disminuir la pérdida de cardiomiocitos viables en esta zona umbral. También existe apoptosis en áreas de reinfarcto¹⁸. Se ha observado que la inhibición de la apoptosis miocárdica mejora el remodelado cardíaco y la contractilidad tras el infarto de miocardio¹⁹.

En la cardiopatía isquémica crónica, la apoptosis puede intervenir en el proceso progresivo de pérdida de cardiomiocitos y condicionar una dis-

función ventricular²⁰. De hecho, la mejoría que ocasionan los bloqueadores beta sobre la evolución de la insuficiencia cardíaca podría estar mediada por inhibición de la apoptosis inducida por catecolaminas. Así, el carvedilol protege ante la apoptosis mediada por estímulo betaadrenérgico y el losartán, ante la apoptosis mediada por la angiotensina II. La serpina y el bosentán son factores antiapoptóticos que pueden prevenir la apoptosis inducida por hipoxia en el cardiomiocito²¹.

En el desarrollo de cardiopatía isquémica en pacientes diabéticos, se ha demostrado el importante papel de la apoptosis, ya que la elevación de la glucemia arterial inhibe la apoptosis de las arterias coronarias, aumentando los factores antiapoptóticos Bcl-xL y Bfl-1A1²². Éste puede ser uno de los factores más tempranos del desarrollo de arteriosclerosis.

Otra área de interés de la apoptosis es el papel que ejerce en la reestenosis del injerto coronario^{23,24}. En zonas reestenóticas se observa un aumento de apoptosis en la placa respecto a las placas primarias. En estas zonas reestenóticas se ha descrito un incremento de la replicación de las CMLV, y el leve aumento de apoptosis que se detecta en ellas es insuficiente para frenar esta replicación, lo que resulta en un incremento de células en la íntima. En modelos animales de reestenosis es posible inducir apoptosis de las células endoteliales de la íntima, lo que podría mejorar el grosor final de la pared arterial.

Una agresión aguda a la pared vascular, como puede ser la dilatación de balón en la angioplastia, se sigue de apoptosis en la íntima y CMLV, que aparece de 30 min a 6 h después. Esta evidencia de que la apoptosis puede regular el aumento de CMLV tras la angioplastia ha llevado a plantear tratamientos para incrementarla. Así, Polman utilizó un oligonucleótido para potenciar el factor antiapoptótico BCL-x, con lo que conseguía apoptosis de las células neointimales y regresión del engrosamiento de la íntima. En otras aproximación, se ha propuesto liberar Fas-L en la pared arterial²⁵ o utilizar una combinación de adenovirus expresando proteínas, combinado con ganciclovir e irradiación. Sin embargo, la utilización de estos modelos no está aún validada, ya que existe el riesgo de que al tratar la reestenosis se pueda producir rotura de placa y trombosis. También se ha implicado la apoptosis en la formación de aneurismas arteriales tras la angioplastia coronaria. En este caso, la pérdida de CMLV y la degradación de matriz extracelular serían los principales factores²⁶. En modelos animales de engrosamiento

de la íntima tras lesión por balón, se ha observado muerte celular por apoptosis en la media arterial, un hecho asociado a la inhibición de la apoptosis mediada por el factor antiapoptótico BCL-x²⁷. También en la íntima se observa un incremento variable de los índices de apoptosis celular, que varían entre un 2 y un 20%.

En el trasplante cardíaco se ha detectado apoptosis endotelial coronaria mediada por un proceso citotóxico tipo T en los vasos del corazón trasplantado. Éste podría ser un mecanismo inicial que sustentaría la base patogénica del rechazo y su control podría aminorar la presencia de la vasculopatía y de rechazo del injerto vascular en el corazón trasplantado²⁸. En esta situación, se ha propuesto un efecto beneficioso de las estatinas, de los bloqueadores de los canales del calcio y de los inhibidores de la enzima conversiva de la angiotensina (ECA), cuya base patogénica podría estar también mediada por su efecto antiapoptótico vascular²⁹.

Apoptosis en las enfermedades del miocardio

Ya desde la fase embrionaria, los mioblastos están sometidos a procesos de regulación de su proliferación, diferenciación y configuración celular y tisular final a través de mecanismos de apoptosis. Se cree que muchas cardiopatías congénitas o la masa cardíaca final estarían mediadas por un condicionamiento apoptótico en el período embrionario o perinatal. Así, se han podido correlacionar los índices de apoptosis con la masa ventricular en diferentes localizaciones miocárdicas. Los procesos ulteriores de atrofia, hipertrofia o degeneración miocárdica pueden estar también regulados en parte por apoptosis. Sin embargo, los mecanismos específicos y el papel final que la apoptosis tiene sobre los cardiomiocitos está aún por dilucidar.

En contraposición con la idea clásica de que el cardiomiocito era una célula diferenciada terminal, sin capacidad de replicación, recientemente se ha comprobado su capacidad de replicación³⁰. De forma progresiva, han aparecido estudios que comprueban que la apoptosis interviene directamente en la patogenia de muchas enfermedades miocárdicas²⁶. De hecho, la pérdida de cardiomiocitos sin evidencia de necrosis se asume que es debida a apoptosis. Ello abre un amplio camino hacia la denominada plasticidad miocárdica y de los procesos de necrosis y regeneración celular que la modulan, muchos de ellos con intervención de mecanismos de apoptosis³⁰. Así, el incremento de la actividad apoptótica de una determinada zona del miocardio evitaría su hipertrofia y podría dar lugar a procesos de degeneración y muerte celular. Al contrario, la

inactivación de la apoptosis podría aumentar la hipertrofia y regeneración de una zona miocárdica, con su consiguiente hipertrofia. Por ello, incluso se ha postulado un papel "fisiológico" de la apoptosis en la mecánica cardíaca.

Los cardiomiocitos pueden desarrollar apoptosis al ser sometidos a hipoxia, isquemia u otras alteraciones tóxicas o metabólicas. Uno de los modelos clásicos de lesión miocárdica por apoptosis es la miocardiopatía tóxica por adriamicina o doxirrubicina, con un efecto dependiente de la dosis mediado por mecanismos de estrés oxidativo³¹. La apoptosis ha demostrado ser un mecanismo útil para la eliminación de células miocárdicas dañadas por virus o tóxicos, actuando en este sentido con un papel defensivo. Se cree que muchas miocardiopatías virales pueden tener una lesión mediada por apoptosis. Sin embargo, no se ha podido relacionar el grado de apoptosis con la carga viral que soporta el miocardio. Recientemente, se ha objetivado también que el alcohol puede inducir una miocardiopatía dilatada crónica con disfunción ventricular progresiva, en cuya patogenia interviene, al menos parcialmente, el desarrollo de apoptosis³². Es posible que la apoptosis tenga un papel destacable también en otras miocardiopatías tóxicas.

La estimulación betaadrenérgica aumenta la incidencia de apoptosis miocárdica, a través de la mediación de las proteínas G acoplada al receptor betaadrenérgico.

La angiotensina II es un factor trófico para las células miocárdicas y vasculares, pero también puede facilitar su apoptosis. La angiotensina II induce apoptosis en cardiomiocitos ventriculares *in vitro* a través de la activación de la proteincinasa c y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Este efecto se puede inhibir con quelantes de calcio tipo BAPTA/AM o de inhibidores de AT-II, como el losartán. El estrés oxidativo puede también inducir apoptosis miocárdica a través de activación del factor TNF- α ³³.

El importante papel energético de las mitocondrias en el cardiomiocito hace que la activación mitocondrial de apoptosis tenga un papel preponderante en las enfermedades miocárdicas. Por ello, la activación del poro de permeabilidad mitocondrial (MPP), la activación de las caspasas y la regulación de la $[Ca^{2+}]_{ic}$ mitocondrial pueden ser especialmente importantes en el campo de las miocardiopatías, con repercusión en los potenciales tratamientos que se puedan proponer.

En las miocardiopatías evolucionadas existe una elevación del índice miocárdico de apoptosis, que se cree que podría intervenir en el proceso progresivo de pérdida de cardiomiocitos y condicionar la

disfunción ventricular crónica, tanto sistólica como diastólica³⁴⁻³⁶. Así, en la miocardiopatía idiopática dilatada se ha descrito un mayor número de cardiomiocitos apoptóticos, con índices de apoptosis de 10-35% valorados por TUNEL³⁷. Sin embargo, es lógico suponer que no todos estos cardiomiocitos con signos de apoptosis van a desarrollar finalmente necrosis. Dado que la apoptosis se produce en 24 h, esta situación significaría una pérdida masiva de cardiomiocitos que no se corresponde con la situación clínica del paciente²⁶. Para evitar esta elevada incidencia de falsos positivos, debe añadirse al TUNEL una técnica morfológica o de transcripción, con lo que los índices de apoptosis son muy inferiores, situándose por debajo del 1%^{11,38}.

En los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica existe una primera fase con hipertrofia compensadora, en la que se detecta la activación de factores antiapoptóticos (BCL-2). Sin embargo, en fases más evolucionadas se promueve la apoptosis de los cardiomiocitos inducida por citocinas, estimamiento mecánico y radicales libres. En pacientes con insuficiencia cardíaca se ha detectado una elevación de las concentraciones circulantes de la proteína proapoptótica Fas. A la vez, también se elevan los valores de BCL-2, probablemente como respuesta compensatoria antiapoptótica.

En los explantes cardíacos de estos pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada sometidos a trasplante cardíaco se ha objetivado un índice de apoptosis de los cardiomiocitos 200 veces superior que en los corazones control, así como un aumento de expresión de BCL-2. Por todo ello, se considera que la apoptosis puede contribuir a la pérdida de cardiomiocitos y, consecuentemente, a la progresión de la insuficiencia cardíaca^{35,36}.

En el fenómeno de hibernación miocárdica o *stunning*, que se puede observar en diversas situaciones, como tras intervenciones cardíacas, se cree que la falta de respuesta dinámica cardíaca estaría mediada por apoptosis³⁹. También en la displasia arritmogénica del ventrículo derecho se ha descrito un mayor índice apoptótico y un aumento de activación de la caspasa 3 en los cardiomiocitos^{20,40}. Se cree que la causa sería la hipoxia asociada a repetidos episodios de arritmia. En el corazón del anciano, se creía que la apoptosis justificaría los fenómenos de pérdida de contractilidad. Sin embargo, se ha observado un índice de apoptosis similar que en el corazón joven, por lo que no queda plenamente justificada esta hipótesis. Respecto a diferencias de género, se ha objetivado un mayor índice de apoptosis en el corazón de varones que en el de mujeres⁴¹. En el rechazo del trasplante cardíaco,

la apoptosis está habitualmente presente, incluso en fases tempranas. Su grado depende de la infiltración macrofágica del injerto y se cree que está mediado por ON y activación del Fas. Existe también apoptosis de las células endoteliales, inflamatorias e intersticiales, lo que contribuye al grado final de rechazo del injerto. En los tejidos trasplantados, una mayor expresión de BCL-2 permite una mayor supervivencia, probablemente porque aumenta su resistencia al daño oxidativo y apoptótico.

Apoptosis en la hipertensión arterial

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales y musculares lisas de la pared arterial tienen un bajo índice de recambio celular y también de apoptosis⁴². Los principales mecanismos de protección endotelial contra la apoptosis son el ON a través de la activación del GMP-cíclico⁴³ y la inactivación de las caspasas por medio de la S-nitrosilación, que protegería de la apoptosis inducida por TNF- α .

En la HTA esencial se desarrollan evolutivamente numerosos cambios en el endotelio vascular y en la pared arterial, incluyendo el engrosamiento de la media en arterias de pequeño calibre por un aumento de las células musculares lisas vasculares, lo que conlleva una mayor propensión al desarrollo ulterior de arteriosclerosis. De hecho, se cree que la proliferación de las células vasculares puede ser un componente importante en la patogenia de la HTA⁴⁴. En estados avanzados de HTA se ha descrito un incremento del balance entre proliferación y apoptosis de CMLV, debido a que se suprime la apoptosis. Otra consecuencia de lo anterior es que las células cardiovasculares de pacientes hipertensos sufren un recambio celular más acelerado, lo que potencialmente culmina en un envejecimiento temprano.

En un interesante estudio de Díez et al en pacientes hipertensos esenciales a los que se realizaba biopsia endomiocárdica, se demuestra en estos pacientes un mayor índice de apoptosis detectada por TUNEL y activación de la caspasa 3 que en los controles no hipertensos⁴⁵. Este elevado índice apoptótico disminuía en pacientes tratados con losartán, pero no en aquellos que recibieron amlodipino, lo que hace suponer una participación de la angiotensina II en la estimulación cardíaca de la apoptosis. Sin embargo, la eficacia del efecto hipotensor no se correlaciona con la reducción de apoptosis miocárdica. De forma colateral, se observó que el tratamiento con losartán afectaba también a la expresión de las proteínas reguladoras de apoptosis en el miocardio, con una disminución de

un 18% de la actividad del factor preapoptósico Bax y aumento del 77% de la del factor antiapoptósico BCL-2⁴⁶. Este estudio corrobora datos experimentales previos que objetivaban una mayor expresión del factor preapoptósico Bax en el corazón de ratas espontáneamente hipertensas⁴⁷.

En pacientes hipertensos se ha observado que el remodelado vascular contribuye a aumentar las resistencias periféricas, con impacto sobre la evolución y complicaciones de la HTA. Se han descrito variaciones, tanto en aumento como en descenso, de los índices de apoptosis celular en la media arterial en diferentes tejidos. La respuesta inflamatoria, que tiene un importante papel en el ulterior desarrollo de fibrosis y contribuye a largo plazo al remodelado vascular, puede estar también mediada por los fenómenos de apoptosis. Así mismo, la fibrosis vascular y el *turnover* de colágeno, que influyen en gran manera en el remodelado vascular, pueden estar mediados por apoptosis. El índice de crecimiento celular, la apoptosis y los fenómenos de inflamación y fibrosis están en interrelación con el remodelado arterial en hipertensión⁴⁸.

La apoptosis endotelial puede desempeñar un marcado papel en el desarrollo de la vasculopatía hipertensiva, con influencia posterior sobre la reacción inflamatoria y el grado de vasodilatación. La apoptosis de las CMLV está regulada por receptores de la angiotensina. En estudios de sobrecarga mecánica y con utilización de agonistas vasoconstrictores, como la angiotensina II, se ha demostrado una mayor inducción de apoptosis miocárdica. Este efecto puede ser selectivo, por ejemplo, en el ventrículo izquierdo. El equilibrio entre las acciones tróficas y proapoptóticas de la angiotensina II es importante en la regulación del remodelado cardiovascular que se produce en varias enfermedades. Es interesante la observación de que el tratamiento hipotensor puede inducir apoptosis en las células de la pared arterial de animales hipertensos. Así, los fármacos IECA restablecen la capacidad apoptótica de las CMLV a través de la estimulación del factor proapoptósico BSX⁴⁹. Sin embargo, no se ha demostrado que este efecto proapoptósico sea beneficioso a largo plazo en evitar el desarrollo de arteriosclerosis. Un comportamiento distinto tienen los órganos diana de la HTA, ya que se ha detectado un aumento de apoptosis, tanto en las neuronas sometidas a procesos de isquemia-reperfusión como una mayor expresión del factor preapoptósico Bax en el corazón de ratas espontáneamente hipertensas.

Apoptosis y arteriosclerosis

Ya en las primeras descripciones de la placa arteriosclerótica primaria se había evidenciado la presencia de destrucción de células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular (CLMV). Inicialmente, se creyó que se trataba de un proceso de necrosis celular, pero posteriormente se observó que era la apoptosis el mecanismo responsable²³. De hecho, la apoptosis interviene fisiológicamente en la eliminación de sustancias tóxicas o nocivas intracelulares y, así, evita el componente oxidativo o inflamatorio añadido que estas sustancias pueden comportar en la placa. Existe una clara relación entre arteriosclerosis y apoptosis, una situación que puede afectar tanto a las células endoteliales como a las CMLV y a los macrófagos. Los índices de apoptosis en las placas de ateroma son muy variables y oscilan desde un 2 a un 30% de las células^{50,51}. La supresión de este fenómeno de recogida y destrucción de detritus celulares o cuerpos apoptóticos incrementa en gran manera la inestabilidad de la placa y el riesgo de rotura⁵¹⁻⁵³. Por otra parte, en placas con elevado riesgo trombogénico, un exceso de apoptosis puede contribuir a incrementar su estado procoagulante e inestabilizar aún más la situación trombogénica de la placa. Por todo ello, el significado que tiene la apoptosis en la placa arteriosclerosa depende del tipo celular implicado, así como del estado de la placa, de su potencial oxidativo y de la densidad celular de la zona.

Las CMLV de la placa arteriosclerosa demuestran un aumento de expresión de factores proapoptóticos y, en consecuencia, son más susceptibles a desarrollar apoptosis. Debido a su bajo índice basal de replicación, un leve incremento de apoptosis puede suponer ya una considerable pérdida de estas células, con lo que se disminuye la síntesis de colágeno tipo I y III y se altera la formación de núcleo fibroso y estría grasa de la placa de ateroma²⁶, hechos que contribuyen a inestabilizar la placa y a su posible rotura¹⁰. En el desencadenamiento de apoptosis de las CMLV se ha implicado también el papel de las metaloproteasas y de diversas citocinas secretadas localmente por las células espumosas. Las CMLV que migran de la media hasta el espacio subintimal presentan un mayor índice apoptótico que las que permanecen en la zona media de la pared vascular. Así mismo, la apoptosis de las CMLV predomina en las zonas con menor densidad celular y no está relacionada con los índices de síntesis y reparación del ADN^{54,55}.

Además, las CMLV apoptóticas de la placa frecuentemente no se eliminan, lo que puede ocasionar

calcificación ulterior de la matriz de las vesículas, aumentando el riesgo de trombogenicidad de la placa. El control de la proliferación de las CMLV mediante mecanismos de apoptosis es trascendental en la aparición del engrosamiento de la media y de la pared arterial, hechos cruciales en la arteriosclerosis.

También las células endoteliales sufren procesos fisiológicos de apoptosis que regulan su grado de proliferación. La integridad endotelial es un factor trascendental para la protección de la pared vascular contra la apoptosis. Existe relación entre el índice de recambio celular endotelial y el desarrollo de apoptosis. En cambio, es muy poco frecuente encontrar apoptosis endotelial en ausencia de enfermedad vascular²⁹. Es difícil diferenciar los marcadores de activación o lesión endotelial de los propios de apoptosis. De hecho, los factores de riesgo clásicos para arteriosclerosis, como la elevación de la glucemia, las lipoproteínas oxidadas de baja densidad, la angiotensina II y el estrés oxidativo, estimulan la apoptosis de las células endoteliales⁵⁶.

La apoptosis endotelial suele ser el inicio de la apoptosis vascular, ya que se detecta en fases tempranas sin observarse su activación en CMLV o macrófagos locales. Altera la protección anticoagulante basal del epitelio, activa las moléculas de adhesión e incrementa el riesgo de inflamación y trombosis local. Todo ello puede provocar disfunción endotelial, inhibición de la angiogénesis vascular y potenciación de la formación de la placa de ateroma. En fases iniciales, la apoptosis endotelial comporta una posible activación de las moléculas de adhesión endotelial. En fases más avanzadas de la lesión aterosclerótica, la apoptosis incrementaría los valores de factor procoagulante tisular y, con ello, el riesgo trombótico de la placa. Un efecto colateral peculiar de la apoptosis es que aumenta la liberación de células endoteliales circulantes que se despegan de la capa basal endotelial al perder sus soportes²⁹.

Los macrófagos de la placa arteriosclerótica pueden sufrir procesos de necrosis o de apoptosis. Probablemente se produce necrosis si las caspasas intracelulares macrofágicas no están activadas y apoptosis si lo están. La apoptosis de estos macrófagos se produce a través de la activación de la proteína p53, en relación con el daño oxidativo y la liberación de ON, y se observa en las zonas con mayor síntesis o reparación de ADN. Los índices más elevados de apoptosis se encuentran en placas evolucionadas en las zonas donde existen macrófagos. La apoptosis macrofágica conlleva una menor actividad metaloproteasa y disminuye la rotura del colágeno. Sin embargo, puede tener algunos efectos perjudiciales indirectos al disminuir la elimina-

ción de los cuerpos apoptóticos que, así, se acumulan sin poder ser fagocitados en ausencia de macrófagos. Además, los macrófagos apoptóticos no eliminados de la placa permanecen en ella como micropartículas, lo que puede activar factores tisulares trombogénicos. Por todo ello, el resultado final de la apoptosis macrofágica puede ser o no beneficiosa para la estabilidad de la placa⁵¹.

El óxido nítrico o su isoforma iNOS puede tener un papel ambivalente en la apoptosis endotelial⁵⁷. Por una parte, actúa como inhibidor a través de la desactivación de las caspasas mediante su S-nitrosilación. Por otra parte, la producción de superóxido que comporta puede formar peroxinitritos, que son inductores de apoptosis. Se ha observado que el ON induce apoptosis en la musculatura lisa vascular y en los monocitos adyacentes. En cambio, concentraciones elevadas de BCL-2 tienen un efecto antiapoptótico y favorecen la acumulación intimal de células musculares lisas. El ON también puede cambiar el balance de apoptosis a necrosis, ya que favorece la presencia de reacción inflamatoria, aumenta el tamaño central del núcleo de la placa y su riesgo subsecuente de rotura de placa y trombosis local.

Posibilidades terapéuticas de modificación de la apoptosis

La utilización de un tratamiento modulador de la apoptosis debe basarse en el conocimiento del mecanismo específico de activación, de la naturaleza de su acción y de sus efectos finales. En los momentos actuales, la posibilidad de modular la apoptosis ya ha dejado de ser una ficción para convertirse en una progresiva realidad, que debe ir mejorando en el futuro, a medida que se conozcan mejor los mecanismos íntimos en los que se basa la apoptosis cardiovascular. De hecho, es posible que muchos de los actuales fármacos con efecto terapéutico activo cardiovascular lo consigan a través de modificación de la apoptosis²⁶.

En la HTA se ha demostrado que los inhibidores de la ECA y los antagonistas de los receptores AT1 disminuyen los índices de apoptosis miocárdica. Así, se ha objetivado que el tratamiento con losartán en pacientes hipertensos disminuye el índice de apoptosis miocárdica respecto a los tratados con amlodipino⁴⁵. En estos pacientes existe un aumento de actividad BCL-2 que actúa como un efecto antioxidante y claramente antiapoptótico⁵⁸.

En las zonas periféricas sometidas a isquemia aguda y en las situaciones de reperfusión miocárdica, el control de la apoptosis podría disminuir la pérdida de cardiomiocitos de la zona umbral²⁶. En

este sentido, se ha propuesto la utilización de serpina y bosentán como factores antiapoptóticos que pueden prevenir la apoptosis inducida por hipoxia miocárdica^{18,21}. También se ha propuesto la transferencia del *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), que bloquea la apoptosis en modelos de isquemia-reperfusión⁵⁹.

Existe la posibilidad potencial de modular la apoptosis para prevenir o tratar la reestenosis del injerto coronario. En este sentido, se han utilizado oligonucleótidos que potencian el factor BCL-x, con lo que se conseguía apoptosis de las células neointimales y regresión del engrosamiento de la íntima⁶⁰. En otra aproximación, se ha propuesto liberar Fas-L en la pared arterial²⁵ o utilizar una combinación de adenovirus expresando proteínasa, combinado con ganciclovir e irradiación. Sin embargo, la utilización de estos modelos no está aún validada, ya que existe el riesgo de que al tratar la reestenosis se pueda producir rotura de placa y trombosis.

La disminución del contenido lipídico circulante puede comportar una disminución ligera de los índices de apoptosis en la placa arteriosclerosa a través de la supresión de la actividad proapoptótica mediada por el factor BAX, lo que puede repercutir en la estabilidad de la placa¹⁰. Las estatinas inhiben la proliferación celular, tienen efecto antiinflamatorio crónico e inducen apoptosis. Esta correlación entre hipercolesterolemia y apoptosis cardiovascular abre la posibilidad de utilizar estatinas en la prevención antiapoptótica⁶¹.

La modulación de la apoptosis puede tener un papel relevante en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Se ha observado que los cardiomiocitos aislados de corazones en situación de insuficiencia cardíaca tienen una activación excesiva de apoptosis. Además, presentan infrarregulación de los receptores betaadrenérgicos, y suprarregulación de la β -AR-cinasa, lo que puede ser un mecanismo de protección o adaptación para el desarrollo de miocardiopatía. Se ha propuesto la transferencia por adenovirus del factor antiapoptótico BCL-2, que bloquearía la apoptosis mediada por p-53 en los miocitos ventriculares, lo que prevendría la apoptosis inducida por isquemia.

La endotelina-1 puede prevenir la apoptosis inducida por estimulación betaadrenérgica en los cardiomiocitos⁶². En cambio, la activación de receptores de adenosina provoca apoptosis en el miocardio. La insulina previene la apoptosis de cardiomiocitos inducida por estrés oxidativo⁶³.

La inhibición de las caspasas ha demostrado que previene la disfunción cardíaca dependiente

de apoptosis. La administración de z-VAD-fmk, un inhibidor de amplio espectro de las caspasas mitocondriales, previene la disfunción cardíaca mediada por mecanismos de apoptosis en un modelo experimental de sepsis en ratas⁶⁴. Es destacable que la inhibición de las caspasas debe ser global, ya que si sólo se inhibe una de las dos vías de su activación (la mitocondrial o la extramitocondrial), el proceso de apoptosis sigue produciéndose⁶⁵. Éste es, sin duda, uno de los mecanismos más claros a través del cual se puede modular apoptosis. Sin embargo, no se conocen los efectos que esta inhibición global de las caspasas pueden inducir⁶⁴.

En mujeres posmenopáusicas, el exceso de riesgo cardiovascular que tienen puede ser atenuado con el tratamiento sustitutivo con estrógenos, un fenómeno mediado por inhibición de apoptosis⁶⁶. De hecho, los estrógenos inhiben la apoptosis endotelial en un 50% de su índice basal, lo que disminuye el grosor intimal. El tratamiento con estrógenos previene la apoptosis inducida por estrés oxidativo (H_2O_2) en la célula endotelial vascular en ratas, lo que supone reducir el desarrollo de la primera fase de la lesión arteriosclerosa. Además, disminuye la migración y proliferación de la CMLV, lo que potencia aún más la posibilidad de desarrollar arteriosclerosis.

Otros fármacos antiapoptóticos

Algunos fármacos, como la amiodarona, producen su efecto terapéutico y/o tóxico a través de la inducción de apoptosis celular activando la caspasa 3 vía BAX⁶⁷. En teoría, los fármacos bloqueadores de receptores Ca^{2+} deberían disminuir la apoptosis al inhibir la entrada de $[Ca]_{i,c}$, pero no han demostrado de forma suficiente su papel antiapoptótico. Se ha observado que el ON induce apoptosis en la musculatura lisa vascular y en los monocitos adyacentes. La endotelina-1 puede proteger ante el daño por apoptosis inducido por estrés oxidativo en el cardiomiocito⁶⁸. Se ha postulado que algunos factores tróficos, como la cardiotrofina-1 o el insulín-GF-1, podrían enlentecer o anular algunos procesos de apoptosis en los cardiomiocitos⁵⁴. En la apoptosis inducida por AT-II se puede inhibir con quelantes de Ca^{2+} tipo BAPTA/AM o de inhibidores de AT-II como el losartán. Se ha propuesto un efecto antiapoptótico miocárdico inhibiendo activación del TNF- α , aunque algunos estudios controlados recientes (RECOVER, RENAISSANCE) sugieren que no existe beneficio con la utilización de etanercept, un bloqueador selectivo de TNF- α .

Perspectivas futuras de la apoptosis en las enfermedades cardiovasculares

Se preve que la apoptosis tendrá un papel cada vez más relevante en las enfermedades cardiovasculares. Actualmente se intenta, a través de la modulación de la apoptosis, disminuir el grosor arterial y mejorar la estabilidad de las placas de ateroma. La apoptosis también puede ser útil en la prevención de la pérdida de cardiomiocitos, en la evolución de lesiones reestenóticas y en la prevención de formación de las placas primarias de arteriosclerosis⁶⁹ y en la prevención temprana de rechazo de trasplante cardíaco⁷⁰. Sin embargo, no todos los aspectos de la inducción de apoptosis son favorables y existen claras limitaciones en su utilización terapéutica, ya que se puede incrementar secundariamente la inestabilidad de la placa.

Es posible que la apoptosis endotelial sea un marcador temprano de la posterior lesión vascular, lo que permitiría una intervención precoz para limitar el daño celular final²⁹. Es muy interesante la correlación entre hipercolesterolemia y apoptosis⁶¹, ya que se abre la posibilidad de utilizar estatinas en la prevención antiapoptótica. Igual sucede con la potencial utilización de ON, que induce apoptosis en la musculatura lisa vascular y en los monocitos adyacentes y del IGF-1, que tiene un potencial efecto de inhibición de la apoptosis miocárdica mediante mejora del remodelado cardíaco y la contractilidad tras el infarto agudo de miocardio¹⁹.

También se ha implicado el papel de la apoptosis en la senescencia celular, ya que una inhibición selectiva de la apoptosis podría producir una mayor longevidad celular. De hecho, la degradación de la síntesis del ADN que se observa en la senescencia y en la apoptosis también tiene aspectos comunes⁷¹.

Un hecho a tener en cuenta al inhibir las vías de apoptosis es la presencia de efectos colaterales. Así, se sabe que la inhibición de la apoptosis vía Fas puede inducir arritmias²⁶. Otra limitación es que muchos de los tratamientos antiapoptóticos precisan para su acción la transfección a las células cardíacas, hecho de difícil ejecución práctica y que limita en gran manera su aplicación. Esta limitación no existe en los factores solubles, como el IGF-1, la cardiotrofina 1 y las neurorregulinas. También parece más fácil regular la apoptosis de manera aguda (p. ej., tras el infarto agudo de miocardio) que de manera crónica (p. ej., en la insuficiencia cardíaca)²⁶.

En resumen, las perspectivas futuras de modulación de la apoptosis en las enfermedades cardiovasculares permiten ser moderadamente optimistas, ya que se conocen parcialmente los mecanismos sobre los que actuar y también la manera de hacerlo. Sin

embargo, al ser la apoptosis un proceso complejo y con muchos mecanismos de activación y contrarregulación, las intervenciones que se realicen para su modulación pueden estar sometidas a múltiples efectos colaterales o secundarios que las pueden hacer menos efectivas. Por ello, sólo una investigación sistemática de los mecanismos de modulación de la apoptosis permitirá definir las posibilidades reales de intervención terapéutica en las enfermedades cardiovasculares^{59,72}.

Bibliografía

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-22.
- Vaquero M. Apoptosis: ser o no ser, ésa es la cuestión. *Med Clin (Barc)* 2000;114:144-56.
- Steward BD. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1286-96.
- Joris ML. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-5.
- Carson DA, Ribeiro AM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-4.
- Saunders JW. Death in embryonic systems. *Science* 1966;154:604-12.
- Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathway of cell death: Oncosis, Apoptosis and Necrosis. *Toxicol Pathol* 1997;25:82-8.
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications in cardiovascular disease. *Cir Res* 1998;82:1111-29.
- Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97:2307-15.
- Davies MJ. Apoptosis in cardiovascular disease. *Heart* 1997;77:498-501.
- de Blois D, Orlov SN, Hamet P. Apoptosis in cardiovascular remodeling-effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:539-45.
- Feuerstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res* 2000;45:560-9.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell-death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
- Blankenberg FG, Strauss HW. Noninvasive strategies to image cardiovascular apoptosis. *Cardiol Clin* 2001;19:165-72.
- Best PJM, Hasadi D, Samgiorgi E. Apoptosis: basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:14-22.
- Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, Maes A, Mortelmans L, Flammeng W, et al. Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *Eur Hear J* 2002;23:849-57.
- Olje E, Clausen OP, Yndestad A, Groggaard HK, Attramadal H. Endothelin receptor antagonism attenuates cardiomyocyte apoptosis after induction of ischemia in rats. *Scand Cardiovasc J* 2002;36:108-16.
- Li Q, Li B, Wang X. Overexpression of insulin-like growth factor 1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilatation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997;100:1991-9.
- Colucci WS. Apoptosis in the heart. *N Engl J Med* 1996;335:1224-6.
- Gurevich RM, Regula KM, Kirshenbaum LA. Serpin protein CrmA suppresses hypoxia-mediated apoptosis of ventricular myocytes. *Circulation* 2001;103:1984-991.
- Sakuma H, Yamamoto M, Okumura M, Kojima T, Maruyama T, Yasuda K. High glucose inhibits apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells by increasing bcl-xL and bfl-1/A1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;263:C422-8.

23. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and reestenosis. *Circulation* 1995;91:2703-11.
24. Bauiedel G, Schluckebier G, Hutter R. Apoptosis in reestenosis versus stable angina. Implication for the pathogenesis of reestenosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1132-9.
25. Sata M, Perlman H, Muruve DA. Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1213-7.
26. Bennet MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 2002;87:480-7.
27. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 1997;95:981-7.
28. Dong C, Wilson JE, Winters JL. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest* 1996;74:921-31.
29. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000;117:841-54.
30. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 2002;415:240-3.
31. Kumar D, Kirhenbaum LA, Danelisen I, Signal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. *Antiox Redox Signal* 2001;3:135-45.
32. Jänkälä H, Eriksson CJ, Eklund KK, Härkönen M, Mäki T. Combined calcium carbimide and ethanol treatment induces high blood acetaldehyde levels, myocardial apoptosis and altered expression of apoptosis-regulating genes in rat. *Alcohol Alcoholism* 2002;37:222-8.
33. Aikawa R, Nitta KY, Kudoh S, Takano H, Nagai T, Yazaki Y, et al. Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF- α . *Cytokine* 2002;18:179-83.
34. Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335:1182-9.
35. Williams RS. Apoptosis and heart failure. *N Engl J Med* 1999;96:1580-5.
36. Olivetti G, Abbi R, Quani F. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-41.
37. Hong BK, Kwon HM, Byun KH, Kim D, Choi EY, Kang TS, et al. Apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Korean J Intern Med* 2000;15:56-64.
38. Charper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz* 1999;24:219-24.
39. Schmitt JP, Schroder J, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. Role of apoptosis in myocardial stunning after heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1229-35.
40. Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A, et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998;152:479-84.
41. Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, Expósito B, Belmin J, Lecompte D, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *J Gerontol Biol Med Sci* 2001;56:19-23.
42. Newby A, Zalsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000;190:300-9.
43. Polte T, Oberle S, Schröder H. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor- α -induced cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. *FEBS Lett* 1997;409:46-8.
44. Hamet P, Thorin-Trescases N, Moureau P, Tea BS, deBlois D, Kren V, et al. Excess growth and apoptosis. Is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* 2001;37:760-6.
45. González A, López B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Díez J, Fortuño MA. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension. Potential role of angiotensin II. *Hypertension* 2002;39:75-80.
46. Díez J, Panizo A, Hernández M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 1997;29:776-80.
47. Fortuño MA, Zalba G, Ravassa S. P-53 mediated upregulation of BAX gene transcription is not involved in bax- α protein expression in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999;33:1348-52.
48. Integan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension. Roles of apoptosis, inflammation and fibrosis. *Hypertension* 2001;38:581-7.
49. Scharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens* 1998;11:1108-16.
50. Geng Y-J, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. *Am J Pathol* 1995;147:251-66.
51. Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, specially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996;149:367-80.
52. Kockx MM, Knaapen MWM. The role of apoptosis in vascular diseases. *J Pathol* 2000;190:267-80.
53. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis and plaque rupture. *Circ Res* 2002;87:184-8.
54. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. Programed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1997;81:137-44.
55. Crisby M, Kallin B, Thyberg J, Zhivotovsky B, Orrenius S, Kostulas V, et al. Cell death in human atherosclerotic plaques involves both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis* 1997;130:17-27.
56. Dimeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher A. Angiotensin II induces apoptosis in human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997;81:970-6.
57. Cromheeke KM, Kockx MM, De Meyer GRY. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 1999;9:744-54.
58. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
59. Hajjar RL, del Monte F, Matsui T, Rosenzweig. Prospects for gene therapy for heart failure. *Circ Res* 2000;86:616-21.
60. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell BCL-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nature Med* 1998;4:222-7.
61. Rajamannan NM, Sangiorgi G, Springett M, Arnold K, Mohacsai T, Spagnoli LG, et al. Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve. *J Heart Valve Dis* 2001;10:371-4.
62. Araki M, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Fujita M, Sawamura T, Kakita T, et al. Endothelin-1 as a protective factor against beta-adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1411-8.
63. Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Atagiri H, Asano T, Zhu W, et al. Insulin prevents cardiomyocyte from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 2000;102:2873-9.
64. Nevière R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:218-25.
65. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-8.
66. Sudoh N, Toba K, Akishita M, Ako J, Hashimoto M, Iilima K, et al. Estrogens prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Circulation* 2001;103:724-9.
67. Choi IS, Kim BS, Cho KS, Park JC, Jang MH, Shin MC, et al. Amiodarone induces apoptosis in L-132 human lung epithelial cell line. *Toxicol Lett* 2002;132:47-55.
68. Kakita T, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Adachi S, Morimoto T, Wasa H, et al. Calcineurin pathway is required for endothelin-1 mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res* 2001;88:1220-2.
69. Guevara NV, Chan L. Apoptosis in atherosclerosis: pathological and pharmacological implications. *Pharmacol Res* 2001;44:59-71.
70. Miller LW, Granville DJ, Narula J, McManus BM. Apoptosis in cardiac transplant rejection. *Cardiol Clin* 2001;19:141-54.
71. Bowles JT. The evolution of aging: a new approach to an old protein biology. *Med Hyac Theses (Engl)* 1998;31:179-221.
72. Fernández-Solà J, Nicolas-Arfelis JM. Apoptosis e implicaciones clínicas. *Med Interna* 1999;17:425-68.