

Apoptosis: bases genéticas y moleculares, implicancias clínicas y terapéuticas.

Frank Lizaraso Soto¹

Definición

Apoptosis es un término introducido en 1972 por Kerr Wyllie y Currie (1) e indica muerte celular programada, muerte fisiológica o "suicidio celular". Traducida del griego, quiere decir "caída de hojas en otoño o los pétalos de las flores".

Kerr y colaboradores en 1972 (1) describieron este término en oposición a la necrosis luego y durante el proceso isquémico (2) del tejido hepático al ligar la V. Porta, observando desde el punto de vista histológico necrosis central y en la periferie unas características muy diferentes de la necrosis clásica, denominándole "necrosis por contracción" por la contracción celular que se observaba. Posteriormente, adoptó el nombre de "Apoptosis" sugerida por James Cormack clasicista de la Universidad de Edimburgo.

Importancia

Dentro de la fisiología de los organismos animales, juega un rol muy importante en el mantenimiento de la hemostasis celular, de los tejidos durante el desarro-

llo embrionario y durante la etapa adulta eliminándose células que no se van a utilizar en el futuro.

Este equilibrio o hemostasia celular se da entre dos acontecimientos importantes del desarrollo: la proliferación celular y la muerte celular, de tal forma que se mantiene un número constante de células, en cada linaje o estirpe celular.

Además, el organismo utilizaría este mecanismo para defensa, en situación en que deben eliminarse células dañinas, peligrosas o infectadas por virus evitando su expansión; también estaría presente en el caso de células con daño en su ADN y que producen mutaciones o son portadoras de estos defectos (3).

La apoptosis ocurre en el desarrollo del corazón embrionario, así como también en diferentes estados patológicos cardíacos, de la etapa adulta. Esto es importante por que se pensaba que las células diferenciadas o de diferenciación terminal en la etapa postnatal, como es el caso de los cardiomiocitos y las neuronas, no estaban regidas por apoptosis; sin embargo, reportes recientes han demostrado que esto sí ocurre,

¹ Cardiólogo - Doctor en Medicina / Profesor de la Universidad de San Martín de Porres.

pero que estarían inducidas por factores externos, como la isquemia y la hipoxia (4) y otros factores más como veremos más adelante.

Diferencias entre Necrosis y Apoptosis

Este proceso de eliminación de células en forma programada, tiene características morfológicas típicas que la diferencian de la necrosis.

Magno y Joris en 1995 (5) definen dos tipos distintos de muerte celular "muerte celular por suicidio" (apoptosis) y "muerte celular por homicidio". En la apoptosis se producen una serie de alteraciones celulares como condensación del núcleo, fragmentación de la cromatina, además el ADN se fragmenta y luego la cromatina forma pseudópodos en el núcleo que se escinden y forman semilunas conteniendo cromatina (oligonucleosomas), luego se retraen y condensan originando los llamados "cuerpos apoptóticos". Estos están formados de organelas y rodeadas de membrana plasmática, de tal manera que en un inicio esta membrana plasmática mantiene su integridad (4).

Hay ausencia de tumefacción celular, de liberación del contenido intracitoplasmático, por lo tanto no hay inflamación. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o células vecinas que en otras circunstancias carecen de esta propiedad. Según Cohen (1993) (6) toda célula nucleada probablemente tenga capacidad fagocítica y puede digerir células que han muerto apoptóticamente, por ejemplo cita a las células epiteliales.

La necrosis por el contrario presenta alteración en la integridad celular, tumefacción celular, se vacuoliza, libera sustancias líticas, forma ampollas exofíticas, libera material intracitoplasmático y luego las ampollas exofíticas son fagocitadas por macrófagos de la inflamación. Su desencadenante es injuria celular y es un proceso sin consumo de energía.

La apoptosis se inicia por activación de proteinasas endógenas (caspasas) y lleva a consumo de ATP y contiene ARNm de los genes responsables de este proceso.

Tabla Nº 1
Apoptosis vs. Necrosis

Características	Apoptosis	Necrosis
Distribución	Células esparcidas	Células contiguas
ADN	Patrón en "escalera", frag. 180 pb.	"Manchas de ADN"
Volúmen celular	Disminuído	Aumentado
Organelas	Intactas	Tumefactas
Integridad celular	Pequeños fragmentos	Ruptura
Destino	Fagocitosis	Liberación del contenido
Inflamación	Ninguna	Extensa

Mecanismo: Bases moleculares y genéticas

Wyllie AH en 1980 (7) publicó un trabajo experimental de apoptosis mediante la sensibilidad *in vivo e in vitro* de los timocitos inmaduros al corticoide, que les producía muerte celular. Observó en ellos la fragmentación del ADN por medio de electroforesis en gel, cuyas características eran bandas de 200 pb (pares de bases) "en escalera". Este investigador relacionó esta fragmentación a una observada anteriormente producida por una endonucleasa dependiente de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ que reducía el ADN con el mismo patrón de fragmentos. Su hipótesis, que luego fue confirmada por Steller en 1995 (8) era pues, que la célula en res-

puesta a una determinada señal ponía en marcha una endonucleasa endógena y producía apoptosis. Típicamente los fragmentos de ADN del nucleosoma medían de 180-200pb o sus múltiplos.

La apoptosis es un mecanismo que se ha mantenido por siglos a través de la evolución y se estudió muy bien en el nemátodes caenorhabditis elegans (c. elegans). Los genes identificados en éste son el ced-3 (ced = celular death), ced-4 y ced-9. Los dos primeros conducen a la muerte celular programada y el último similar a la familia Bcl-2 en humanos la inhibe. El ced-4 no se ha encontrado en los vertebrados.

Los genes que codifican ced-3 y ced-4 son constitutivos y expresan una proteína ICE (enzima convertidora de interleukina 1-B), que es una endonucleasa (proteasa de la cisteína) que escinde al ADN.

El ced-3 codifica una caspasa. Las proteinasas relacionadas al gen bcl-2, regulan la actividad de las caspasas halladas en los mamíferos. Bcl-2 y Bcl-XL inhiben la muerte celular programada, mientras BAX y BAK la promueven. Esta familia de proteínas se regula por fosforilación, de tal manera que cascadas de fosforilación - desfosforilación pueden servir de señal extracelular para activarlas.

Bcl-2 y Bcl-XL regulan la liberación del citocromo-c desde las mitocondrias al citosol. El citocromo-c es una proteína de la cadena respiratoria mitocondrial, localizada en la membrana de las mitocondrias y se libera previo al desarrollo de apoptosis, activando las caspasas. Se cree que las mitocondrias tengan un rol protagónico en el inicio del proceso (8) que una vez iniciado se mantiene por sí mismo. Las caspasas son las proteasas de serina y cisteína que van a fragmentar el ADN.

El gen crm-A inhibe ICE, a través del crm-A que es miembro de las serpinas y actúa como barredor de proteasas. Las serpinas son una familia de inhibidores de la proteasa de la serina. Entre las serpinas conocidas tenemos a la antitrombina, inhibidor de la coagulación y la antiplasmina del sistema fibrinolisis.

La proteína P-53, supresora del tumor se ha propuesto como mediadora de apoptosis y es la contraparte de la proteína Bcl-2 que la previene.

En el hombre también se ha hallado una proteína de membrana, que es de la familia del TNF (factor de necrosis tumoral), denominada Fas, que es un receptor con dominio extracelular que contiene subdominios ricos en cisteína y un dominio intracelular llamado "dominio de muerte", porque desencadena la muerte celular. El gen Fas se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 (10q), (9).

La proteína Fas se trimeriza en el citoplasma y produce apoptosis, desencadenado por TNF y diversas citoquinas denominadas "ligando Fas" (Fas-L), teniendo una gran importancia en el sistema inmunitario, en enfermedades autoinmunes, SIDA, trasplante de médula ósea (10).

Los factores de crecimiento y protooncogenes son reguladores positivos de la progresión del ciclo celular,

mientras los genes supresores de tumores (P-53) se oponen a la proliferación celular incontrolada, a través de la inhibición de los protooncogenes. Por ello se les consideraría como verdaderos agentes apoptóticos.

La mayoría de células están programadas para "suicidarse", al poseer proteínas constitutivas para este fin, habiendo ausencia de nuevas proteínas, con excepción de muerte celular programada fisiológica, en que se producen síntesis de nuevas proteínas. Las células requieren de señales de supervivencia, en forma regular o a intervalos, de no ser así activarían su mecanismo de muerte.

Se afirma que la apoptosis es un mecanismo bien programado y codificado genéticamente ya que envuelve iniciadores y reguladores específicos, comandados por genes específicos. Los iniciadores que se postulan son citoquinas pro-inflamatorias, TNF-a, IL-1, interferón- γ , sistema de ligandos Fas (Fas-L) y los productos génicos c-myc y P-53. Los factores reguladores proapoptóticos serían el BAX, BAD; antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL.

Las enzimas caspasas, el citocromo-c y el PARP (Poly-ADP-ribosa-Polimerasa) que es una enzima reparadora del ADN, juegan importante papel en este proceso (11).

Métodos bioquímicos que miden Apoptosis

Recordar que mientras los "cuerpos apoptóticos" son evidencia ultraestructural de apoptosis, el ADN fragmentado es su marcador bioquímico.

Mencionaremos algunos de los métodos existentes sin desarrollar cada uno:

TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nickend labelling*); fragmentos de ADN "en escalera" por electroforesis en gel de agarosa, marcadores de ANEXINA V y por Elisa para medir ADN en oligonucleosoma.

Apoptosis y aparato cardiovascular

Antes de desarrollar Apoptosis en el aparato cardiovascular, debemos decir que hay enfermedades asociadas a inhibición de apoptosis (como el cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciones virales) y otras por el contrario asociadas a enfermedades con un exceso de aceleración de apoptosis (ver Tabla N° 2), (10).

Tabla Nº 2

Enfermedades relacionadas a Apoptosis

Enfermedades asociadas con inhibidores de Apoptosis	Enfermedades asociadas con aumento de Apoptosis
Cáncer	Enfermedades neurodegenerativas
Enfermedades autoinmunes	Enfermedad de Alzheimer
Infecciones virales	Enfermedad de Parkinson
	Retinitis pigmentosa
	Osteoporosis
	Isquemia-reperfusión por injurias
	IMA
	Ictus
	Síndrome mielodisplásico
	SIDA
	Enfermedades tóxico hepáticas
	Corticoides
	Radiación
	Quimioterapia

Apoptosis y desarrollo cardíaco embrionario

La apoptosis ocurre en el desarrollo cardíaco, durante la etapa embrionaria, interviene en la formación del bulbus cordis y troncocono, cojines endocárdicos, vasos arteriales, etcétera, de tal forma que alteraciones en este mecanismo serían responsables de alteraciones cardíacas congénitas. También interviene como mencionamos anteriormente en diferentes patologías cardíacas de la etapa adulta. Revisaremos brevemente su intervención en este sistema.

El sistema de conducción ya está formado en las primeras semanas de gestación, pero está especialmente modulado en el período postnatal inmediato. Los miocitos y el colágeno constituyen el nodo sinusal embriológico (12). Luego del nacimiento los miocitos pasan a formar grupos pequeños de células, llamadas células "P", interconectadas por largas y delgadas células de transición. La apoptosis del resto de miocitos resulta en acumulación de colágeno.

El nodo A-V tiene abundantes células "P" al nacer, pero en la adultez el cuerpo de fibrosis central pierde todos los circuitos nodales, por medio de apoptosis, quedando pequeños grupos de células P, esparcidas en la región baja del nodo A-V, cerca de la rama Hissiana principal (Haz de Hiss), (12).

La falta de apoptosis y persistencia del tejido de conducción en el nodo A-V, lleva a reentradas y taquiarrit-

mias reentrantes. El retraso de apoptosis explicaría las arritmias malignas que se resuelven espontáneamente.

Por el contrario, la excesiva apoptosis conduciría a bradiarritmia y muerte súbita cardíaca. James y colaboradores (13) reportaron un caso de un recién nacido con displasia ventricular derecha, en que la FC atrial era 150x' y la ventricular 50x', el deterioro fue progresivo y el infante falleció. La autopsia mostró apoptosis extensa en el Haz de Hiss, con extensión al nodo A-V. Además, hubo apoptosis masiva en el ventrículo derecho incluyendo septum y bandas parietales de la crista supraventricularis. El ventrículo izquierdo y ambas aurículas eran normales. Este caso interesante mostraba la destrucción simultánea en diferentes regiones del mismo órgano con destrucción celular y sin signos de inflamación y que podría dar manifestaciones clínicas cardiovasculares diversas.

Se ha sugerido (14) que la displasia ventricular arritmogénica que es una forma de cardiopatía del ventrículo derecho y muerte súbita se debe a apoptosis, consecuencia de episodios repetidos de isquemia-reperfusión asociado a arritmia, lo que llevaría a pérdida celular y su reemplazo progresivo por tejido grueso y fibroso.

Se ha documentado apoptosis en la cardiomiopatía inducida por Marcapaso ventricular a altas frecuencias cardíacas, corazones transplantados y probablemente miocarditis aguda y crónicas (11).

Apoptosis en cardiomiopatías

La cardiomiopatía (CMP) dilatada causa de insuficiencia cardíaca; en su estadio inicial muestra hipertrofia miocárdica compensatoria por el bajo gasto cardíaco. Esta hipertrofia se ha asociado a promotores de crecimiento como el c-myc, c-fos, factor de crecimiento transformante-, que también promueve apoptosis (15). Pero la hipertrofia no puede mantenerse indefinidamente desde que no responden por hiperplasia, por tanto lo sigue la muerte celular (15).

Narula y colaboradores (16) propusieron apoptosis como la vía por la cual se llega al deterioro de la función ventricular izquierda y estadio final de la insuficiencia cardíaca. A pesar de estas observaciones e hipótesis no puede darse una respuesta concluyente de qué mecanismos de falla cardíaca sean totalmente explicados por apoptosis.

Experimentalmente se está intentando detener este mecanismo o minimizarlo por medio del uso de antiapoptóticos, como son los moduladores de factores de crecimiento y citokinas, pudiendo favorecerse así una forma de prevención del deterioro ventricular (4).

Jutta Scheper et al. (17), en una revisión que realizan acerca del rol de apoptosis en CMP dilatada, concluyen que si bien su función está claramente establecida en la isquemia aguda y el miocardio hibernado, en la progresión de insuficiencia cardíaca hacia la dilatación, falta aún determinarse.

Apoptosis e Isquemia Miocárdica

Los factores de estrés para producir necrosis y apoptosis incluyen a la isquemia, la hipoxia, la deficiencia nutricional y agentes citotóxicos (quimioterápicos).

En estudios experimentales como el de Saraste A et al., (18) se observó células apoptóticas en la reperfusión tras el infarto miocárdico agudo, lo cual no se vió en infartos con oclusión permanente de la arteria o sea sin reperfusión. Observaron aumento de calcio intracelular y radicales libres en la zona reperfundida, proponiéndolos como inductores de apoptosis, hecho que actualmente se ha confirmado.

Se han observado células apoptóticas en la zona central de la necrosis, sugiriendo que estaría la necrosis precedida de apoptosis. Este período de transición resultaría de isquemia e hipoxia incrementadas.

Histológicamente se observa expansión progresiva del estado picnótico al kariolítico del cardiomiocito.

Hay otros trabajos experimentales como el de Kajstura J et al., (19) que observaron que tras la oclusión coronaria, la apoptosis es muy precoz con un máximo de 4.5 horas, mientras la necrosis alcanza su máximo a las 24 horas. Además observaron una mayor extensión de la apoptosis de hasta 6 veces en relación a la necrosis.

Hotta y Nakai de la Universidad de Morika en Japón (20) estudiaron la isquemia miocárdica transitoria y completa, tras la oclusión coronaria en ratas. Mostraron que las células subendocárdicas, sufrían apoptosis en la isquemia transitoria y en la completa, mientras que las células subepicárdicas sufrían necrosis en la oclusión completa, por lo que estarían también contribuyendo a una mayor hipoxia, que por sí sola produce apoptosis.

Se han encontrado otros agentes apoptóticos en la isquemia, como la proteína P-53 (21), la cual mostraba una expresión aumentada. También el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que tiene una expresión aumentada en la reperfusión de la isquemia (22); la presencia de calcio intracelular aumentado y radicales libres, factores consignados como proapoptóticos en esta situación.

Por otro lado. Sawa et al., de la Universidad de Ojaka (23) mostraron en ratas sometidas a isquemia miocárdica, que luego de ser reperfundidas, mejoraban mucho al incorporarles liposomas con el gen Bcl-2, conocido inhibidor de la apoptosis.

La apoptosis podría dar ciertas ventajas en relación a necrosis por la ausencia de inflamación y posterior fibrosis (cicatrización). Se ha observado que la pérdida de miocitos en riesgo dejaría áreas con menor arritmogenicidad, que la que dejaría la necrosis. La apoptosis sería causa de desaparición del infiltrado de células intersticiales que se observan posterior a un infarto miocárdico (24).

En el remodelado ventricular tras el IMA, interviene la necrosis pasiva y apoptosis activa. La apoptosis en respuesta a isquemia podría provocar activación de genes de respuesta inmediata de carácter proliferativo (10).

La hipoxia, la isquemia y la reperfusión activan genes de respuesta inmediata y probablemente sea a través de apoptosis.

Trabajos experimentales en cerdos, como el de Brand y colaboradores (25) descubrieron la activación de genes de respuesta inmediata c-fos, erg-1 y jun-B, tras la reperfusión.

Yao y colaboradores de la Universidad de Tokio (26) encontraron activación de la expresión de c-jun, c-fos y c-myc durante la reperfusión en miocitos embrionarios de pollo. Observaron que c-jun requiere de proteinkinasa C (PKC) para activarse y c-fos y c-myc podrían activar la cascada de protequinas activadas por mitógenos, que aumentan durante la reperfusión.

Se sugiere que estos genes de respuesta inmediata intervienen en el proceso de remodelación cardíaca y este podría ser una respuesta compensadora a la apoptosis.

Apoptosis y el proceso arterosclerótico

Debemos mencionar que la apoptosis está comprometida potencialmente en el remodelado de las paredes arteriales asociadas a Hipertensión Arterial Primaria, Hipertensión Pulmonar Primaria, injertos venosos para By-Pass, injuria arterial post-angioplastia (11).

En el proceso aterosclerótico, interviene generando inestabilidad de la placa de ateroma y esto lo consigue reduciendo el número de células musculares lisas con función fagocítica y reduciendo células endoteliales de la placa. También lo logra al reducir células musculares lisas de la placa próximas o contiguas al lumen, en su intento por aumentar el diámetro de la luz del vaso de la zona afectada. Esto resulta en disminución del depósito de la matriz extracelular y su mantenimiento, alterando la integridad de la placa, haciéndola inestable y vulnerable (27). También está implicada en la extensión de la placa al producir junto con la necrosis destrucción de las células espumosas en el core lipídico.

Por otro lado, la apoptosis interviene en el mecanismo de estabilización de la placa de ateroma, produciendo Apoptosis de macrófagos en la capa fibrosa de la placa evitando que estos destruyan el colágeno (28). Mientras por un lado debilita la capa fibrosa, paradójicamente por otro lado lo evita; por lo que es necesario entender este proceso en este punto específico, para inclinar el lado de la balanza que sea más favorable.

Implicancias terapéuticas

Definitivamente, la mejor comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares de este proceso llevará a mejorar la lucha contra la alta morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares.

Tendríamos la posibilidad de evitar llegar al estadio final de la insuficiencia cardíaca, la posibilidad de estabilizar las placas de ateromas, de optimizar la terapia antihipertensiva, de evitar el proceso patológico de la remodelación ventricular post-infarto, evitar la reestenosis post-angioplastia, controlar la extensión del tejido fibroblástico tras el infarto o enfermedades inflamatorias como las miocarditis.

Si logramos dominar o manejar la muerte apoptótica ya sea previniéndola o acelerándola según convenga hacerlo y en forma muy selectiva, tendríamos un arsenal terapéutico de gran valor. Debemos entender correctamente el mecanismo de los mediadores como, Bcl-XL, P-65, P-53, NF-KB, TNF-, análogos de los factores de crecimiento, las caspasas, la apopaina, enzima identificada últimamente como inductora de Apoptosis, serían potencialmente terapéuticos.

Aún su significado clínico y terapéutico requiere muchas investigaciones a nivel experimental y clínico, pero creemos que con el avance tecnológico acelerado y los conocimientos a nivel genético y molecular, no estamos lejos de lograr los objetivos trazados.

Frank Lizaraso Soto
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres

Referencias bibliográficas

1. KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide - ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26:239-257; 1972.
2. KERR, J.F.R.
Srinkege Necrosis: a distinct mode of celular death. J. Pathol 1971; 105:13-20.
3. PUERTAS, M.J.
Genética: Fundamentos y Perspectivas. 2º Edición Interamericana. Edit. McGraw-Hill; 1999.

4. JAGAT NARULA, M.D. et al.
Apoptosis and the heart. *Chest Nov.* Vol. 112. Number 5, 1997.
5. MAGNO, J.; JORIS, I.
Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J. Pathol*, 146:3-15, 1995.
6. COHEN, J.J.
Apoptosis: The physiologic pathway of cell death. *Hosp. Pract* 28: 35-43; 1993.
7. WYLLIE, A.H.
Glucocorticoid - induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonucleasa activation. *Nature* 284:555; 1980.
8. LIU, X.; KIM, C.N.; YANG, J. et al.
Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement of ATP and cytochrome-c. *Cell* 60:147-57; 1996.
9. NAGATA, S.; GOLSTEIN, P.
The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456; 1995.
10. ZARCO, Pedro.
Bases Moleculares de la Cardiología Clínica. Edit. Panamericana; 1999.
11. ASHOK, M.; SHARAVANAN, K.; PADMA-NABHAM, et al.
Apoptosis in cardiovascular disorders. *Mediforum*, [Http://www.icipharms.com/forum/html](http://www.icipharms.com/forum/html); 2000.
12. JAMES, T.N.
Normal and Abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphology to arrhythmogenesis. *Circulation* 90: 556-73; 1994.
13. JAMES, T.N.; NICHOLAS, M.M.; SAPIRE, D.W. et al.
Complete heart block and fatal right ventricular failure in an infarct. *Circulation* 93: 1588-1600; 1996.
- 14.- MALLAT, Z.; TEDGUI, A. et al.
Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med.* 335: 1190-96; 1996.
- 15.- KATZ, A.M.
The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med* 121: 363-71; 1994.
- 16.- NARULA, J.; HAIDER, N.; VIRMANI, R. et al.
Apoptosis in cardiomyocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335: 1181-89; 1996.
- 17.- SCHEPER, Jutta et al. The role of Apoptosis in Dilated Cardiomyopathy. *Herz* 24: 219-224; 1999.
- 18.- SARASTE, A.; PUKKI, K.; KALLAJOKI, M. et al.
Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95: 320-23; 1997.
19. KAJSTURA, J.; CHENG, W.; REISS, K. et al.
Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributions variables in infarct size in rats. *Circulation* 92 (suppl. 8): I-722; 1995.
20. HOTTA, K.; NAKAI, K.
Is cell death of rat cardiomyocytes following transient ischemia apoptosis? *Circulation* 92 (suppl. 8): I-722; 1995.
21. SHAROV, V.G.; SABBAH, H.N.; GOUSSEV, A.V. et al.
Increased expression of apoptosis associated p-53 protein in cardiocytes of dogs with chronic heart failure. *Circulation* 92 (suppl. 8): I-525; 1995.
22. SHIRAKAWAN, K.; MIURA, T.; YAMAKAWA, K. et al.
Effect of ischemic preconditioning on the expression of TNF - and the induction of apoptosis in the ischemia-reperfused rat heart. *Circulation* 92 (suppl. 8): I-773; 1995.
23. SAWA, Y.; BAI, H.Z.; SUZUKI, K. et al.
Overexpression of Bcl-2 gene improves the myocardial tolerance of ischemia - reperfusion by preventing DNA fragmentation. *Circulation* 92 (suppl. 8): I-526; 1995.
24. TAKEMURA, G.; OHNO, M.; HAYAKAWA, M. et al.
Rol of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 82(11):1130-38; 1998.

25. BRAND, T.; SHARMA, H. S. et al.
Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res* 71: 1351-60; 1992.
26. YAO, A., TAKAHASHI, T.; AOYAGI, T. et al.
Immediate - early gene induction and Map kinase activation during recovery from metabolic inhibition in cultured cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96: 69-77, 1995.
27. KOCKX, M.M.; DE MEYER, G.R.; BUYSSENS, N.; KNAAPEN, M.W. et al.
Cell Composition, replication and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ. Res* 83(4):378-87. 1998.
28. KOCHX, M.M.; HERMAN, A.G.
Apoptosis in atherogenesis: Implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 19: 623-628, 1998.