

Apoptosis en la insuficiencia cardíaca

RAUL OLIVERI

La disfunción miocárdica progresiva en la insuficiencia cardíaca (IC) se debe, al menos en parte, a la pérdida de miocitos cardíacos por apoptosis o muerte celular programada de acuerdo con un programa genético y con consumo de energía. Las anormalidades estructurales que caracterizan a la apoptosis incluyen disrupción miofibrilar, anormalidades mitocondriales expresadas por disrupción de las membranas internas y externas, hiperplasia y reducción del tamaño de las organelas, acumulación de colágeno en el intersticio cardíaco, formación de ampollas en la membrana celular, reducción del volumen de la célula, condensación y fragmentación de la cromatina. La célula se fragmenta en varios cuerpos apoptóticos sin que en ningún momento se pierda la integridad de la membrana. Los fragmentos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas no diferenciadas como macrófagos. La apoptosis se produce en un tiempo muy breve (horas) lo cual dificulta su identificación y su cuantificación. Un fenómeno clave de la apoptosis es la activación de una clase única de proteasas de la cisteína, para cuya denominación se ha adoptado una nueva nomenclatura designándolas como caspasas, de las cuales se han identificado hasta el presente 14 homólogos. Las caspasas pueden propagar la señal apoptótica por desdoblamiento/activación de otras caspasas o pueden ejecutar los eventos terminales de la apoptosis desdoblando sustratos esenciales para la muerte. Existen evidencias que sugieren que la apoptosis puede ser inducida por los mismos agentes que producen necrosis, con el tipo de muerte celular dependiendo de la severidad del estímulo patológico. Dichos estímulos son: niveles elevados de catecolaminas, angiotensina II, citoquinas inflamatorias, anión superóxido, daño por reperfusión, factores de crecimiento, estiramiento mecánico de las miofibrillas, aumento de la concentración de calcio en el citosol e hipoxia. La evidencia de apoptosis de los miocitos en pacientes con IC avanzada puede ser uno de los responsables de la progresión de una miocardiopatía hacia formas graves de IC. Futuras investigaciones deberán definir con mayor precisión los criterios patológicos y moleculares para verificar el desarrollo y la extensión de la apoptosis en los miocitos cardíacos con mayor sensibilidad y especificidad. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 603-607.

Palabras clave Apoptosis - Necrosis - Caspasas - Fragmentación de la cromatina - Insuficiencia cardíaca

El deterioro progresivo de la función ventricular izquierda constituye un hecho característico en la evolución de la insuficiencia cardíaca. A partir de la caída del gasto cardíaco como consecuencia de diferentes causas, se ponen en marcha mecanismos de compensación (dilatación, hipertrofia, modificaciones neurohormonales, etc.) que frecuentemente logran restablecer durante un tiempo determinado una función ventricular aceptable, pero si la noxa persiste (como ocurre habitualmente) esos mecanismos se vuelven deletéreos y son responsables de la progresión de la enfermedad. En los últimos años ha ido surgiendo una nueva hipótesis que atribuye la disfunción ventricular izquierda progresiva, al menos en parte, a la pérdida de miocitos cardíacos. (1) La hipótesis está basada sobre la presencia de cambios degenerativos ultraestructurales de los cardiomiocitos

tanto en corazones humanos insuficientes como en los de animales con insuficiencia cardíaca experimental. Las anormalidades estructurales observadas incluyen disrupción miofibrilar, anormalidades mitocondriales caracterizadas por disrupción de las membranas internas y externas, hiperplasia y reducción del tamaño de las organelas (2) y anormalidades del intersticio cardíaco caracterizadas por acumulación de colágeno. La cromatina nuclear se condensa y se fragmenta formando cuerpos apoptóticos como consecuencia de la ruptura del citoesqueleto y la pérdida de anclaje de la membrana. (3) Cuando se extrae ADN de una célula apoptótica y se estudia por electroforesis sobre un gel de agarosa, en lugar de una mancha única el ADN aparece fragmentado en una escalera de bandas de 200 pb, correspondientes a la distancia entre 2 nucleosomas.

(4, 5) La fragmentación de la cromatina es el sello biológico de la apoptosis; ésta se produciría porque la célula pone en marcha una endonucleasa endógena en respuesta a una señal. (6, 7) El proceso está asociado con la expresión anormal de genes como *Fas*, (8, 9) ICE (*interleukin-1B-converting enzyme*)/CED-3, (10) p53, (11) *c-myc* (12) y *Bax* (13) (activadores de la apoptosis) o una deficiencia de otros genes como el *Bcl-2* (13) o el CED-9 (14) (inhibidores de la apoptosis).

Apoptosis es un término introducido en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie (15) e indica la muerte celular programada o "suicidio celular". Proviene de una palabra griega que significa la caída de las hojas en otoño. La apoptosis constituye un hecho normal en el desarrollo tisular del feto y en el reemplazo celular de ciertos tejidos adultos como el timo [así como en diferentes niveles de la escala zoológica (pérdida de la cola de los renacuajos, por ejemplo)]. En contraste con la necrosis (o muerte celular accidental), la apoptosis representa una serie de eventos moleculares y bioquímicos (energía-dependientes) organizados por un programa genético.

Las células apoptóticas pueden diferenciarse de las que sufren un proceso de necrosis por varias características: a) formación de ampollas en la membrana celular, b) reducción del volumen de la célula, c) condensación y fragmentación de la cromatina nuclear (como se vio antes). Una vez fragmentada la célula, los fragmentos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas no diferenciadas como macrófagos. Toda célula nucleada tiene alguna capacidad fagocítica y puede digerir células que han muerto por apoptosis. (3) La apoptosis se produce en un tiempo muy breve (horas), lo cual dificulta su identificación y cuantificación.

La necrosis, a diferencia de la apoptosis, se caracteriza por depleción del ATP nuclear, daño de las organelas intracelulares, hinchazón y ulterior vacuolización del citoplasma, con la formación de ampollas exofíticas que son fagocitadas con signos de inflamación. La necrosis es un proceso pasivo en el cual la carga osmótica originada por el aumento de permeabilidad de la membrana celular lleva al edema celular. Las células se hinchan y se lisan, liberando en el espacio extracelular material citoplasmático que desencadena la respuesta inflamatoria.

Un fenómeno clave de la muerte celular por apoptosis descrito recientemente es la activación de una clase única de proteasas de la cisteína, para cuya nominación se ha adoptado una nueva nomenclatura designándolas con el término caspasas. Hasta el presente se han identificado 14 homólogos. La expresión ectópica de cualquiera de las proteasas de la familia de las caspasas puede producir apoptosis. (16-20) Ellas constituyen una verdadera maquinaria

efectora para la apoptosis, cuya activación puede tener lugar dentro de los complejos de receptores de muerte de la membrana citoplasmática o por un mecanismo dependiente de las mitocondrias dentro del citosol. (21) Las caspasas pueden propagar la señal apoptótica por desdoblamiento/activación de otras caspasas o pueden ejecutar los eventos terminales de la apoptosis desdoblando sustratos esenciales para la muerte. (21)

Estudios realizados en tejidos de corazones explantados de pacientes con insuficiencia cardíaca terminal han confirmado la presencia de apoptosis de los cardiomiocitos. Narula y colaboradores (22) examinaron 7 corazones de pacientes sometidos a trasplante cardíaco en busca de evidencias de apoptosis. Los 7 pacientes tenían insuficiencia cardíaca crónica grave, 4 por miocardiopatía dilatada idiopática y 3 por miocardiopatía isquémica. Se obtuvieron muestras de tejido miocárdico de 4 pacientes que habían tenido un IAM en las 24 a 48 horas previas, que fueron usadas como controles positivos, mientras que muestras de tejido cardíaco obtenidas de 4 personas muertas en accidentes de tránsito fueron usadas como controles negativos. Para la detección *in situ* de la apoptosis a nivel de las células individuales se utilizó el método del "etiquetado final" (*end-labeling*) mediado por la desoxinucleotidiltransferasa (TdT). (23) Este método incluye la adición de desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con fluoresceína a los fragmentos del ADN producidos por la acción catalítica de la TdT (técnica TUNEL).

Los corazones de los 4 pacientes con miocardiopatía dilatada y de uno de los 3 pacientes con miocardiopatía isquémica presentaban evidencia histoquímica de fragmentación del ADN nuclear. Se observó también evidencia histológica de apoptosis en el área necrótica central de los IAM pero no en la pared ventricular remota a ese área. En el miocardio de los 4 pacientes muertos accidentalmente se observaron miocitos apoptóticos escasos y aislados. La conclusión de los autores es que la pérdida de miocitos debida a apoptosis ocurre en los pacientes con insuficiencia cardíaca terminal y puede contribuir a la disfunción miocárdica progresiva.

Resulta difícil medir el porcentaje de apoptosis en un corazón determinado. Las cifras difieren significativamente en investigaciones recientes, diferencia que puede ser atribuida a causas diversas, como limitaciones técnicas de los procedimientos utilizados y la breve duración del proceso, entre otras. Narula y colaboradores, en el estudio antes citado, (22) encuentran un porcentaje de miocitos apoptóticos de entre el 5% y el 35,5%, mientras que Olivetti y colaboradores, (24) utilizando una técnica muy refinada, encuentran un porcentaje del 0,23% al 0,25% (entre 20 y 142 veces más bajos que los descriptos

anteriormente). Hasta el momento no resulta posible precisar con exactitud el verdadero nivel cuantitativo de la apoptosis en diferentes patologías cardiovasculares, pero su presencia se ha demostrado claramente en las miocardiopatías isquémica y dilatada, en el infarto agudo de miocardio y en la hipertrofia cardíaca.

Mientras que los factores que desencadenan la apoptosis de los cardiomiocitos no está totalmente aclarada, existen evidencias que sugieren que ciertas condiciones comunes al estado de insuficiencia cardíaca podrían contribuir a jugar un papel importante en la promoción de la apoptosis cardíaca. Existen algunas evidencias que sugieren que la apoptosis puede ser inducida por los mismos agentes que producen necrosis, con el tipo de muerte celular dependiendo de la severidad del estímulo patológico. Estos estímulos, presentes con frecuencia en la insuficiencia cardíaca, son capaces de desencadenar la apoptosis en una variedad de células, incluidos los miocitos cardíacos: niveles elevados de catecolaminas, (25-27) angiotensina II, (28, 29) citoquinas inflamatorias, (30, 31) anión superóxido, (32-34) óxido nítrico, (20, 35, 36) daño por reperfusión, (37-40) factores de crecimiento, (41) estiramiento mecánico de las miofibrillas, (42-44) aumento de la concentración de calcio en el citosol (45, 46) e hipoxia. (47, 48) Con respecto a la hipoxia, cabe señalar que ha sido intensamente investigada en los últimos años como uno de los mecanismos más importantes en la inducción de apoptosis en la insuficiencia cardíaca. En efecto, tanto en estudios experimentales en perros como en estudios en humanos se ha demostrado que la más alta incidencia de apoptosis en los cardiomiocitos ocurre en las regiones del miocardio que rodea al área de cicatriz de infartos antiguos donde la fibrosis intersticial tiende a ser más severa. (49) Este fenómeno de la hipoxia miocárdica no es exclusivo de la insuficiencia cardíaca sino que también puede ocurrir en el corazón hipertrofico o en el corazón del anciano debido a defectos de la perfusión miocárdica mediados por una síntesis excesiva de proteínas, sin cambios en el flujo coronario en el primer caso y a una reducción de la resistencia coronaria en el segundo. En ambas situaciones se ha demostrado el aumento en la densidad de cardiomiocitos apoptóticos. (50)

Como alternativa es posible suponer que, al menos en algunos pacientes, la apoptosis refleja una anomalía hereditaria primaria o una predisposición particular. En ellos podría existir un desbalance entre los mecanismos estimulantes e inhibitorios que normalmente regulan la apoptosis. (51)

La insuficiencia cardíaca puede reflejar la pérdida de miocitos, la disfunción de miocitos viables o ambos mecanismos actuando de manera simultánea.

La sobrecarga hemodinámica del miocardio, como ocurre en las regurgitaciones valvulares crónicas o en la porción no infartada del ventrículo después de un IAM, da origen a una disfunción cardíaca progresiva caracterizada por la remodelación del miocardio, una de cuyas características es la reexpresión de un programa genético fetal. Se supone que este fenotipo fetal está asociado con una reducción de la función de los miocitos causada por la expresión de isoformas de proteínas menos funcionales. Los protooncogenes que con mayor frecuencia se activan en la hipertrofia ventricular y en la insuficiencia cardíaca son *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* (genes de respuesta inmediata).

La evidencia de apoptosis de los miocitos en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada sugiere que dicho proceso puede ser uno de los responsables de la progresión de una miocardiopatía hacia formas graves de insuficiencia cardíaca. Un aumento de la concentración del Ca^{++} sarcoplasmático, hallazgo frecuente en la miocardiopatía dilatada, (45) puede activar endonucleasas incluidas en la cascada apoptótica. Adicionalmente a la expresión persistente de protooncogenes y a la sobrecarga de Ca^{++} intracelular, la hipoxia relativa de los miocitos debida a la dilatación o a la hipertrofia ventricular izquierda puede perpetuar la apoptosis.

A pesar de que la apoptosis parece irreversible, algunos autores han sugerido que puede ser modulada por factores de crecimiento o citoquinas. (52) En efecto, se ha demostrado recientemente en experimentos de corto plazo que la inhibición farmacológica de las caspasas puede prevenir la apoptosis de los miocitos inducida por isquemia y reperfusión (40) pero el destino de las células no es claro. No se sabe con certeza si los miocitos isquémicos que han iniciado el camino de la apoptosis y han sido recuperados en forma aguda por la inhibición de las caspasas podrán sobrevivir o si la droga simplemente retarda la muerte celular.

Diremos para finalizar que es de la mayor importancia definir las implicaciones de la apoptosis de los miocitos y su significado en la progresión de las enfermedades cardíacas, así como delinear las potencialidades de una estrategia antiapoptótica para mejorar su evolución. Futuras investigaciones deberán definir con mayor precisión los criterios patológicos y moleculares para verificar el desarrollo y la extensión de la apoptosis de los miocitos cardíacos con mayor sensibilidad y especificidad.

SUMMARY

APOPTOSIS IN HEART FAILURE

Progressive myocardial dysfunction in heart fail-

ure (HF) is due —at least partially— to the loss of cardiac myocytes because of apoptosis or programmed cell death according to a genetic program, with energy expenditure. Structural abnormalities distinctive of apoptosis include myofibrillar disruption, mitochondrial abnormalities —seen as internal and external membrane disruption— hyperplastic and decrement in organelle size, collagen deposition in cardiac interstitium, blebbing of plasma membrane, cell shrinkage and chromatin condensation and fragmentation. Cells fragment in many apoptotic bodies, without losing plasma membrane integrity. Fragments are phagocitized by macrophages or related cells non-differentiated as macrophages. Apoptosis occurs in a short time lapse (hours), making it difficult its identification and quantification. A key phenomenon of the apoptotic process is the activation of a unique class of cysteine proteases, specially named as “caspases”. At present 14 homologues have been identified in this class. Caspases can propagate the apoptotic signal by unfolding or activation of other enzymes in the group, or can perform terminal events in the apoptotic process, unfolding critical substrates to allow cellular death. There is a body of evidence suggesting that apoptosis can be induced by the same agents responsible of necrosis, according to the kind of cell death, depending on the severity of the pathological stimulus. Such stimuli are: increased levels of catecholamines, angiotensin II, inflammatory cytokines, superoxide anion, reperfusion damage, growth factors, mechanical stretching of myofibers, increases in cytosolic calcium levels and hypoxia. Evidence of myocyte apoptosis in patients with advanced HF, may be one of the factors responsible of progression of cardiopathies to severe forms of HF. Future research should provide a deeper knowledge of pathological and molecular criteria to verify the development and extension of apoptosis in cardiac myocytes with additional sensitivity and specificity.

Key words Apoptosis - Necrosis - Caspases - Chromatin fragmentation - Heart failure

BIBLIOGRAFIA

- Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 704-712.
- Sabbah HN, Sharov VG, Riddle JM y col. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 1333-1347.
- Bennett, Gibson DF, Schwartz SM y col. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure to phosphatidylserine. *Circ Res* 1995; 77: 1136-1142.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- Zarco P. Bases moleculares de la cardiología clínica. Madrid, Editorial Médica Panamericana 1996; pp 233-234.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
- Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 1071-1074.
- Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.
- Toyozaki T, Hiroe M, Saito T y col. Levels of soluble Fas in patients with myocarditis, heart failure of unknown origin and in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 1998; 81: 798-800.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA y col. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-46.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J y col. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 532: 345-347.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS y col. Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell* 1992; 69: 119-128.
- Misao J, Hayakawa Y, Ohno M y col. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 1506-1512.
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S y col. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998; 140: 1485-1495.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N y col. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; 189: 381-394.
- Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999; 84: 253-256.
- Hauvstetter A, Izumo S. Apoptosis: Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111-1129.
- Narula J, Haider N, Virmani R y col. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.
- Gavrielli 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.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F y col. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.
- Communal C, Singh K, Pimentel DR y col. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 1998; 98: 1329-1334.
- Shizukuda Y, Buttrick PM, Geenen DL y col. Beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: Influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol* 1998; 275: H961-968.
- Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M y col. Alfa and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell-type specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999; 100: 305-311.
- Kajstura J, Cigola E, Malhotra A y col. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 859-870.
- Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U y col. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997; 81: 970-976.

30. Krown KA, Page MT, Nguyen C y col. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854-2865.
31. Meldrum D. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998; 274: R577-R595.
32. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 96: 3602-3609.
33. Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 1999; 99: 2934-2941.
34. Oskarsson HJ, Coppey L, Weiss RM y col. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis in the remote non-infarcted myocardium following large myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 679-687.
35. Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 588-594.
36. Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor- α induced apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 595-602.
37. Gottlieb R, Burleson K, Kloner R y col. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-1628.
38. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused myocardium. *Circ Res* 1996; 79: 949-956.
39. Zhao Z-Q, Nakamura M, Wang N-P y col. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 651-660.
40. Yaoita H, Ogawa K, Machara K y col. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-281.
41. Osterziel KJ, Strohm O, Schuler J y col. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1998; 351: 1233-1237.
42. Cheng W, Li B, Kujstura J y col. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 1995; 96: 2247-2259.
43. Sadoshima S, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Ann Rev Physiol* 1997; 59: 551-571.
44. Depre C, Davies P, Taegtmeyer H. Transcriptional adaptation of the heart to mechanical unloading. *Am J Cardiol* 1999; 83: 58H-63H.
45. Gwathney JK, Morgan JP. Altered calcium handling in experimental pressure overload hypertrophy in the ferret. *Circ Res* 1985; 57: 836-843.
46. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G y col. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 281-285.
47. Tanaka M, Ito H, Adachi S y col. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426-433.
48. Saikumar P, Dong Z, Weinberg J y col. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998; 17: 3341-3349.
49. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H y col. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; 148: 141-149.
50. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R y col. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 1996; 271: H1215-H1228.
51. Colucci WS. Apoptosis in the heart (editorial). *N Engl J Med* 1996; 335: 1224-1226.
52. Williams GT, Smith CA, Spooncer E y col. Hemopoietic colony stimulating factors promotes cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 76-79.