

Apoptosis: implicaciones en Medicina Intensiva

E. MIÑAMBRES GARCÍA^a Y M. LÓPEZ HOYOS^b

^aServicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

^bServicio de Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

El conocimiento de la muerte celular programada o apoptosis ha experimentado un enorme desarrollo en los últimos tiempos. Los hallazgos realizados implican cada vez más a este tipo de muerte celular con numerosas patologías, incluida la patología crítica. El objetivo de este trabajo es revisar el concepto de apoptosis y su importancia en la fisiopatología del paciente crítico. Los resultados obtenidos hasta la fecha demuestran que la apoptosis interviene en mayor o menor grado en la patogenia de innumerables enfermedades. El uso de bloqueadores de la apoptosis ha mostrado resultados satisfactorios en algunos modelos experimentales, mientras que en otros han sido contradictorios. Es posible que, en un futuro, el uso de medicamentos que permitan modular la apoptosis sea una alternativa terapéutica válida en este tipo de pacientes. Por ello es necesario profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la apoptosis en el paciente crítico.

PALABRAS CLAVE: *apoptosis, muerte celular programada, Medicina Intensiva.*

APOPTOSIS: IMPLICATIONS IN INTENSIVE MEDICINE

Knowledge regarding programmed cell death (apoptosis) has been greatly advanced in recent years. It has increasingly been found that this type of cell death is involved numerous disea-

ses, included critical disease. The aim of this work was to review the concept of apoptosis and its importance in the physiopathology of critical patients. Results obtained up to now have demonstrated that apoptosis intervenes to a greater or lesser extent in the pathogeny of innumerable diseases. The use of "apoptosis blockers" has shown satisfactory results in some experimental models, whereas in others it has been contradictory. In the future, the use of apoptosis-modifying drugs could be a valid therapeutic alternative in these types of patients. As such, it is necessary to explore the physiopathological mechanisms of apoptosis in critical patients.

KEY WORDS: *apoptosis, programmed cell death, Intensive Medicine.*

INTRODUCCIÓN

Los términos "muerte celular programada" y "apoptosis" suelen utilizarse indistintamente para definir un tipo de muerte celular, diferente de la necrosis, que regula de forma fisiológica la homeostasis de un organismo. La apoptosis celular es la base de muchos procesos fisiológicos y su conocimiento ha progresado rápidamente en la última década. Los que inicialmente fueron únicamente hallazgos de laboratorio están adquiriendo, cada vez más, una relevancia clínica. Esta revisión pretende el acercamiento del médico intensivista a los conceptos básicos y a los hallazgos más relevantes descritos hasta ahora sobre la apoptosis en el campo de la Medicina Intensiva. Para facilitar su lectura se ha considerado la apoptosis por órganos y tipos de patologías, asumiendo que esta compartimentalización puede ser artificiosa en muchas ocasiones.

La necrosis celular siempre se ha considerado perjudicial para el organismo. En la muerte por ne-

Correspondencia: Dr. E. Miñambres.
Servicio de Medicina Intensiva.
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
39008 Santander.
Correo electrónico: emgarcia@humv.es

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por una beca FIS (n.º PI020417) y por una beca de la Fundación Marqués de Valdecilla.

Manuscrito aceptado el 29-I-2004

crisis la célula se hincha, pierde la integridad de su membrana y libera el contenido celular. Este hecho da lugar a una respuesta inflamatoria, iniciada fundamentalmente por las enzimas proteolíticas y los radicales libres que la célula muerta albergaba en su interior¹. Por el contrario, la célula apoptótica presenta una balonización de su membrana plasmática, la cromatina nuclear se condensa y disminuye su volumen. Además, diferentes mecanismos activan endonucleasas que degradan el ADN a nivel de los nucleosomas originando el típico patrón en escalera al migrar en un gel de electroforesis^{2, 3}. Así, la célula apoptótica es rápidamente fagocitada y digerida por células fagocíticas vecinas, con lo cual no se libera su contenido y no se originan fenómenos inflamatorios⁴. Kerr et al, al observar estos cambios morfológicos en estudios con embriones, fueron los primeros en utilizar el término apoptosis (del griego *apoptoe-sis*, indicativo de la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor)². A los hallazgos morfológicos le siguieron los estudios moleculares en el gusano *Caenorhabditis elegans*, donde por primera vez se evidenció la existencia de un control genético en la apoptosis celular. Estos trabajos fueron motivo de la concesión del Premio Nóbel de Medicina en 2002. Actualmente los cambios morfológicos de la apoptosis celular se estudian mediante microscopía electrónica y es posible cuantificar la apoptosis por técnicas enzimáticas, inmunohistoquímicas, citométricas y moleculares.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA APOPTOSIS

La muerte celular por apoptosis es un proceso regulado genéticamente, en el cual intervienen moléculas efectoras y moléculas reguladoras de la apoptosis. Muchas de las señales de muerte y supervivencia celular proceden del exterior de la célula a través de receptores de superficie (vías de muerte extrínsecas). Otro mecanismo de inducción de apoptosis es el intrínseco, ante la falta de factores de crecimiento o inducidos por alteración intrínseca de mecanismos reguladores de apoptosis⁵.

Vía de muerte celular extrínseca

La muerte celular por apoptosis puede iniciarse mediante la unión de un ligando de muerte a un receptor especializado (receptores de muerte) en la membrana plasmática de la célula. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). De ellos, el mejor conocido en cuanto a inducción de apoptosis es Fas, el cual se activa al unirse a su ligando (FasL). Estos receptores son proteínas, que se expresan en muchas células del organismo, y presentan a nivel intracelular una secuencia citoplasmática denominada dominio de muerte^{6, 7}. Cuando el receptor de membrana se activa al unirse a su ligando se produce una serie de alteraciones en el domi-

nio de muerte que conlleva un reclutamiento de moléculas adaptadoras que permiten la activación de las caspasas iniciadoras. Esas moléculas adaptadoras son TRADD (dominio de muerte asociado al TNFR) y FADD (dominio de muerte asociado a Fas). Los dominios de muerte asociados a Fas o a TNFR normalmente están inactivos en forma de monómeros. Cuando los ligandos se unen a esos receptores, los dominios de muerte son trimerizados y ya pueden activar a las caspasas iniciadoras y ejecutar el programa de muerte⁸⁻¹⁰ (fig. 1).

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas fielmente conservadas a lo largo de la evolución. Estas proteasas se denominan así por la presencia de un residuo de cisteína en su centro catalítico y por hidrolizar las proteínas detrás del aminoácido aspartato. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos compuestos por diferentes dominios o regiones peptídicas: un dominio amino terminal de tamaño variable, una subunidad larga, una subunidad corta y una región de unión entre ambas subunidades. La activación de las caspasas supone la fase efectora de la apoptosis y se puede producir por numerosos estímulos. Uno de ellos es la activación de la caspasa 8 por la unión de factores solubles (FasL y TNF) a sus receptores de membrana (fig.1). Otro mecanismo regulador de las caspasas es la familia de Bcl-2¹¹.

La activación de cada caspasa se induce por digestión proteolítica entre dominios y por el posterior ensamblaje de las subunidades larga y corta para formar la enzima activa. Las caspasas se clasifican en iniciadoras (caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9 y 10) que tienen prodominios largos, de 15-25 kd, y en efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que tienen prodominios de menos de 5 kd.

El desmantelamiento estructural característico de una célula por apoptosis es un proceso complejo, que implica el procesamiento de un gran número de sustratos celulares por las caspasas efectoras. Uno de los sustratos fundamentales de estas proteasas es la nucleasa responsable de la degradación del ADN. Esta nucleasa corta el ADN genómico entre nucleosomas generando fragmentos de tamaño múltiplo de 180 pares de bases, originándose un patrón en escalera en un gel de agarosa característico de la apoptosis. Esta nucleasa de ADN se denomina Cad (*Caspase-Activated DNase*) y su activación se produce a través de la proteólisis de Icad mediada por la caspasa 3, que permite la liberación y activación de la subunidad catalítica (fig. 1).

Vía de muerte celular intrínseca. Familia de Bcl-2

El otro mecanismo principal de inducción del programa de apoptosis es el intrínseco, a partir de señales intracelulares (fig. 1). Esta vía participa fundamentalmente en aquella muerte celular inducida por privación de factores de crecimiento, radiaciones, corticoides, etc. De la vía intrínseca depende la apoptosis de células durante el desarrollo embrionario y la homeostasis celular en condicio-

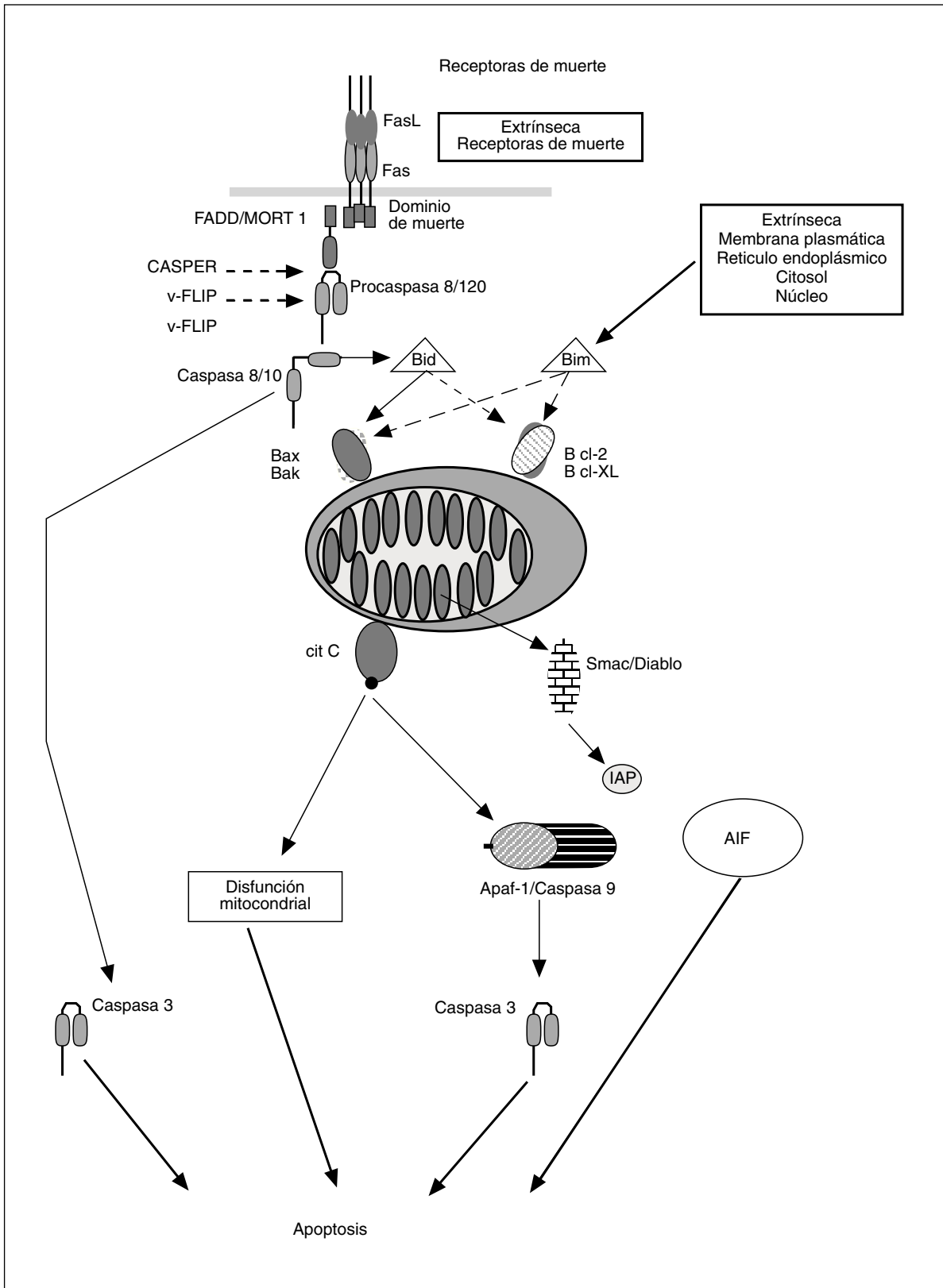


Figura 1. Vías de muerte celular programada. Se representan las principales vías de apoptosis. FasL: ligando de Fas; FADD: dominio de muerte asociado a Fas; cit C: citocromo C; IAP: proteína inhibidora de apoptosis; AIF: factor inductor de apoptosis; Smac/Diablo: Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-binding protein with low pI.

nes fisiológicas. Existe una familia de proteínas esencial en la regulación de la vía intrínseca de apoptosis, conocida como familia de Bcl-2, por ser éste el primer miembro descrito. El gen *Bcl-2* fue identificado por primera vez en un linfoma de células B-2, motivo de su denominación. La familia se compone al menos de 16 miembros¹² (fig. 2). Consta de una variedad de genes agrupados en función de sus características estructurales y funcionales. Entre ellos existen algunos que inhiben la apoptosis y otros que la inducen. Los diferentes miembros de la familia de Bcl-2 se encuentran principalmente en la mitocondria o en el citosol de la célula y forman dímeros entre sí. Los niveles relativos de miembros inductores e inhibidores de la apoptosis funcionan como un reostato regulando el umbral apoptótico de la célula. Así, por ejemplo, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL forman heterodímeros con la proteína proapoptótica Bax, de tal suerte que un exceso de Bax facilitará la muerte celular por apoptosis al incrementar los homodímeros Bax/Bax proapoptóticos, y un exceso de Bcl-2 o Bcl-XL darán lugar al efecto contrario al generar homodímeros Bcl-2/Bcl-2 o Bcl-XL/Bcl-XL y la célula sobrevivirá.

Estudios de mutagénesis han demostrado que los dominios BH1, BH2 y BH3 están implicados en los procesos de homo y heterodimerización. La capacidad de inducir apoptosis por parte de los miembros proapoptóticos puede realizarse mediante la inhibición de miembros antiapoptóticos, a través del dominio BH3, o mediante la capacidad de estas proteínas de insertarse en la membrana mitocondrial y formar poros en dicha membrana. De esta forma, la permeabilización de la membrana exterior de la mitocondria, como parte de la disfunción mitocondrial, se acompaña de la liberación del citocromo C, Smac/Diablo y del factor inductor de la apoptosis (AIF). El citocromo C es un componente de la cadena transportadora de electrones necesaria para la respiración mitocondrial. Cuando se libera dentro del citoplasma, el citocromo C induce la oligomerización de *Apaf1*, y como resultado se activa la caspasa 9 y seguidamente la caspasa 3 (fig. 1).

Existen otras vías de apoptosis como la vía de la perforina-granzima B, utilizada por los linfocitos citotóxicos; la vía de la esfingomielasa, etc. No se va a profundizar en ellas por escaparse de los objetivos de esta revisión.

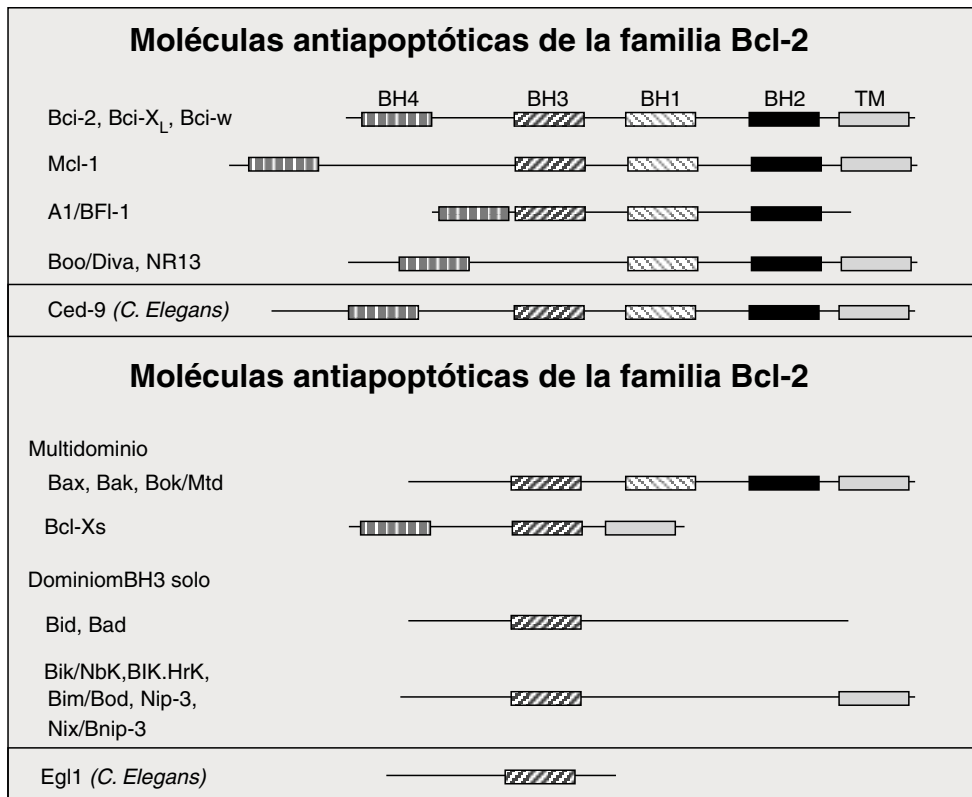


Figura 2. Miembros de la familia de Bcl-2. Los miembros de la familia de Bcl-2 poseen hasta 4 dominios de estructura en hélice de homología (denominados desde BH1 hasta BH4) que se representan por rectángulos. Parte de los miembros se anclan a membranas a través de un dominio transmembranal (TM). Se observa cómo los miembros antiapoptóticos se caracterizan por conservar los 4 dominios BH. Por el contrario, los proapoptóticos se dividen en los que conservan la mayoría de los dominios BH (multidominio) y los que sólo conservan el dominio BH3, junto con la región TM o no. Además, se muestran los homólogos en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) de los miembros de la familia de Bcl-2.

PRINCIPALES DISFUNCIONES ORGÁNICAS Y APOPTOSIS

Son innumerables las patologías en las que se ha demostrado una alteración de la apoptosis, bien por exceso bien por defecto⁴. No obstante, en muchas ocasiones no puede asegurarse que el hallazgo de apoptosis en un proceso patológico sea importante en la patogenia o en la evolución del mismo. A continuación se comentan agrupadas por sistemas algunas de las patologías críticas en las que se han hallado resultados de interés.

Sistema inmunitario

Hasta épocas muy recientes se concebía la sepsis como una respuesta inflamatoria sistémica e incontrolada del organismo a la infección¹³. Sin embargo, a partir del fracaso de la gran mayoría de los ensayos clínicos realizados con medicamentos que bloqueaban la cascada inflamatoria, se ha observado que la respuesta a la infección no es lineal y que existe un perfil inflamatorio variable de unos individuos a otros y también dentro del mismo individuo¹⁴. Ante el estímulo de un patógeno, el organismo reacciona activando el sistema inmune, incluyendo a los macrófagos, células dendríticas y linfocitos T CD4. Los macrófagos y las células dendríticas se activan por la ingestión del patógeno y por la estimulación de las citocinas proinflamatorias secretadas por los CD4. Sin embargo, estos CD4 también pueden liberar citocinas antiinflamatorias que suprimen la activación de los macrófagos, y pueden ser, así mismo, activados por los macrófagos y las células dendríticas. Dependiendo de diversos factores como el patógeno causante de la infección, el sitio de infección, etc., los macrófagos y las células dendríticas responderán favoreciendo la producción de citocinas pro o antiinflamatorias, o favoreciendo una reducción global de la función del sistema inmunitario¹⁴. La apoptosis celular puede favorecer esta depresión inmunitaria producida por la sepsis¹⁵. Diversos estudios experimentales han demostrado que durante la sepsis los linfocitos y las células del epitelio gastrointestinal mueren por apoptosis^{16, 17}. Estos hallazgos fueron refrendados en un estudio autopsico que demostró que los pacientes fallecidos por sepsis tenían una tasa de apoptosis muy superior a los que lo hicieron por otra causa en las células linfocíticas y del epitelio gastrointestinal¹⁸. Los linfocitos y el epitelio gastrointestinal tienen una elevada tasa de recambio celular mediada por apoptosis y, probablemente la sepsis, acelera ese proceso natural¹⁵.

Actualmente existe evidencia de que la inhibición de la apoptosis podría estar desempeñando un importante papel en la reducción de la mortalidad que algunos tratamientos han demostrado recientemente en pacientes con sepsis grave. El efecto beneficioso de la proteína C activada en la sepsis grave¹⁹ podría no deberse únicamente a su efecto antitrombótico, ya que otros medicamentos anticoagulantes fracasa-

ron previamente. Joyce et al²⁰ han demostrado recientemente que la proteína C previene la apoptosis en diversas líneas celulares humanas, incluyendo las células endoteliales, favoreciendo la expresión de genes antiapoptóticos y disminuyendo la expresión de genes proapoptóticos. Además, estimula la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial²¹.

El estudio de los mecanismos intrínsecos antiinflamatorios de los corticoides ha revelado que estos fármacos retrasan la apoptosis de los granulocitos e incrementan la fagocitosis de las células apoptóticas por los macrófagos, procesos que pueden ser esenciales para el control y resolución de la inflamación^{22, 23}. Finalmente, también se han descrito efectos antiapoptóticos para la insulina²⁴, que podrían explicar en parte, su efecto protector en el paciente séptico²⁵.

La inhibición de la apoptosis celular durante la sepsis es una posibilidad terapéutica interesante. En modelos experimentales de sepsis Hotchkiss et al demostraron que la prevención de la apoptosis linfocitaria mejoraba la supervivencia²⁶. También evidenciaron que la sobreexpresión de Bcl-2 en células T de ratones transgénicos disminuía la apoptosis linfocitaria e incrementaba la supervivencia²⁷. Otros estudios experimentales han sugerido que la inhibición de apoptosis intestinal que se produce en la sepsis, mediante la sobreexpresión de Bcl-2 mejora la supervivencia en diferentes modelos de sepsis^{28, 29}.

Los estudios con pacientes son muy escasos hasta la fecha, intentando sobre todo confirmar aspectos fisiopatológicos observados en estudios experimentales. Martins et al observaron en pacientes sépticos un incremento de la capacidad fagocítica de los neutrófilos y una posterior pérdida de neutrófilos por apoptosis que justificaron como un mecanismo regulador de la respuesta inflamatoria³⁰. Aún así, estos resultados deben ser evaluados con cautela porque existen trabajos contradictorios³¹. Los mecanismos responsables de estos hallazgos no son plenamente conocidos. El tratamiento de los pacientes sépticos con inhibidores de la apoptosis es muy controvertido y plantea diversos problemas, entre ellos el control de la inhibición sobre un único grupo celular. Recientemente, Cauwels et al demostraron que el bloqueo indiscriminado de caspasas puede empeorar el pronóstico en modelos experimentales de sepsis. La inhibición general de caspasas incrementó la toxicidad *in vivo* inducida por el TNF produciendo un incremento en el estrés oxidativo, dañando la mitocondria e incrementando la mortalidad³². Actualmente existen diversos estudios en fase experimental y preclínica con inhibidores de las caspasas, en particular la caspasa 3³³.

El tratamiento de la sepsis mediante bloqueo o inducción de la apoptosis es un aspecto novedoso de la terapéutica de la principal causa de mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Es necesario profundizar en el conocimiento de la respuesta inflamatoria y del papel que tiene la apoptosis.

Sistema nervioso central

El estudio de los mecanismos de apoptosis durante la embriogénesis y la homeostasis celular del sistema nervioso central (SNC) en la vida adulta ha sido facilitado, en gran medida, por el conocimiento de la muerte celular programada en otros sistemas celulares y tisulares³⁴. Pero este tipo de muerte celular no participa sólo en la fisiología del SNC. En los últimos años han aparecido trabajos que muestran cómo la muerte neuronal apoptótica contribuye al desarrollo de alteraciones neurodegenerativas del SNC, como el Parkinson^{35, 36}, enfermedad de Huntington, epilepsia, enfermedad de Alzheimer^{35, 37} y en trabajos experimentales de isquemia cerebral^{38, 39}. A raíz de estos trabajos, en la última década se comenzó a estudiar la posible implicación de la muerte por apoptosis en el daño cerebral agudo (DCA), tanto por traumatismo craneoencefálico (TCE), como por hemorragia cerebral (HC) o ictus isquémico. Rink et al, en 1995, describieron por primera vez la presencia de neuronas apoptóticas en modelos experimentales de cerebros de ratas sometidos a un TCE⁴⁰. Estos hallazgos se han observado recientemente en cerebros humanos sometidos a un DCA^{41, 42}.

Los trabajos mencionados han impulsado los estudios encaminados a determinar la importancia que puede tener la apoptosis neuronal en el pronóstico de los pacientes con un TCE. Así, ha aumentado la evidencia acerca del papel decisivo que tiene la familia de Bcl-2 en la regulación de la apoptosis en pacientes que sufren dicho tipo de traumatismo. Raghupathi et al demostraron que la sobreexpresión de Bcl-2 humano en ratones transgénicos disminuía el daño a nivel neuronal y se reducían las secuelas motoras tras inducirse un TCE⁴³. Estos resultados fueron refrendados por nuevos estudios experimentales que confirmaron el papel neuroprotector de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en modelos experimentales de TCE⁴⁴. En un estudio con 11 pacientes a los que se practicó una craniectomía para extirpar las áreas de contusión cerebral debidas a un TCE, se demostró que la expresión del gen Bcl-2 en las áreas pericontusionales se asociaba con una mayor supervivencia de los pacientes⁴⁵. Otros trabajos han demostrado, tanto en cerebros de ratas⁴⁶⁻⁴⁹ como de seres humanos⁴² sometidos a un TCE, que existe una regulación alterada de la familia Bcl-2 y de las caspasas tras una lesión cerebral.

El cerebro humano es capaz de sintetizar factores solubles tras un TCE⁵⁰⁻⁵². De hecho, se ha observado cómo la acumulación de componentes séricos extravasados en la zona de edema cerebral se acompaña de muerte celular por apoptosis en las células circundantes⁵³. Por ello, nuestro grupo se ha centrado en el estudio de factores solubles obtenidos a partir del suero drenado del bulbo de la vena yugular interna en pacientes que sufrieron un TCE, analizando, de esta forma, los posibles factores solubles sintetizados a nivel cerebral tras un TCE grave. Así, hemos demostrado que el suero obtenido del bulbo de la vena yugular interna (regional) de pacientes

que han sufrido un TCE es capaz de inducir apoptosis *in vitro* de células linfoides^{54, 55}. La apoptosis observada podría estar inducida por la expresión aumentada de una proteína proapoptótica (Bax) y la disminución de la expresión de una proteína antiapoptótica (Bcl-XL). Asimismo, la tasa de apoptosis observada se ha correlacionado con la mortalidad y la situación funcional de los pacientes a los 6 meses del TCE⁵⁴ (manuscrito enviado para publicación).

Se han realizado experimentos con diversos medicamentos inhibidores de la apoptosis en modelos experimentales de TCE. Siren et al demostraron que la administración de eritropoyetina en ratas sometidas a una oclusión de la arteria cerebral media disminuyó el número de neuronas que presentaron apoptosis y, paralelamente, la extensión del infarto cerebral⁵⁶. Este mismo grupo de trabajo demostró que el pretratamiento con eritropoyetina disminuía la apoptosis en cultivos neuronales a los que se retiraron los nutrientes⁵⁶. Nuevos estudios han refrendado estos resultados⁵⁷. Otros autores han mostrado que el tratamiento con inhibidores de la caspasa 3 mejora el pronóstico en modelos experimentales de TCE⁵⁸ y de infarto isquémico cerebral⁵⁹.

La lesión cerebral traumática es uno de los campos de la Medicina Intensiva donde mayores avances se han producido en relación con el papel de la muerte celular programada. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos a nivel experimental, son necesarios más estudios que permitan confirmar en seres humanos la posibilidad de utilizar, en un futuro, bloqueadores de la apoptosis como terapia en pacientes con un TCE.

Sistema respiratorio

La lesión pulmonar aguda (LPA) se asocia a una rotura del epitelio alveolar, de la membrana basal y del endotelio, lo que produce un incremento de la permeabilidad del epitelio pulmonar⁶⁰. Existe un gran interés en conocer el papel de los mediadores inflamatorios en la patogénesis del daño epitelial y endotelial de la LPA. En los últimos tiempos se ha comenzado a estudiar el papel que desempeña la apoptosis en los pacientes con LPA⁶¹.

La LPA y el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) pueden agravarse por los neutrófilos que liberan proteasas y radicales libres. La neutrofilia característica del SDRA puede deberse a una alteración en la migración, a un exceso de activación o a un descenso en la apoptosis de los neutrófilos. Los mediadores inflamatorios como citocinas, la hipoxia y la acidosis activan a los neutrófilos y retrasan su apoptosis. No se conocen completamente los mecanismos que producen la inflamación alveolar en la LPA o en el SDRA, pero la apoptosis de los neutrófilos podría ser un importante mecanismo regulador, permitiendo la eliminación de los neutrófilos del área afectada con un mínimo daño pulmonar^{62, 63}. Los neutrófilos se eliminan del pulmón por macró-

fagos y otras células fagocíticas. El receptor del macrófago CD44 parece tener un papel fundamental en el aclaramiento de los neutrófilos apoptóticos *in vivo* e *in vitro*^{64, 65}. En modelos experimentales de LPA con ratones transgénicos carentes de CD44, se ha observado que el aclaramiento de neutrófilos disminuía de forma muy importante, aumentando la inflamación pulmonar y la tasa de mortalidad de los ratones⁶⁵. Sin embargo, existen muchas lagunas en el conocimiento de estos procesos. La apoptosis de los neutrófilos puede retrasarse por factores como los factores estimulantes de colonias monocito-macrófago (GM-FSC). En un estudio realizado por Matute-Bello et al se observó que el líquido broncoalveolar (LBA) de pacientes con SDRA tenía concentraciones elevadas de GM-FSC. Se vio que los pacientes con SDRA que sobrevivieron tenían una mayor tasa de GM-FSC que los fallecidos⁶⁶. Estos autores concluyeron que en ciertos casos (como el SDRA asociado a infecciones bacterianas) la inhibición de la apoptosis de los neutrófilos podía ser beneficiosa. Estos hallazgos aumentan la discrepancia entre los autores acerca del efecto beneficioso o nocivo de la apoptosis en la LPA y en el SDRA.

Otra de las características del SDRA es la destrucción del epitelio alveolar y la afectación del endotelio en los capilares alveolares. Diversos estudios han demostrado que en pacientes con SDRA el mantenimiento de la función epitelial se asocia con un mejor pronóstico^{67, 68}. Bachofen et al mostraron en pacientes fallecidos en el curso inicial del SDRA que los neumocitos tipo I morían por apoptosis⁶⁹. Estudios posteriores evidenciaron un incremento de *Bax* (gen proapoptótico) en las células del epitelio alveolar⁷⁰. Otros autores han demostrado que la expresión de Fas está incrementada en pacientes fallecidos por SDRA. Asimismo, FasL puede cuantificarse en el líquido del edema pulmonar de pacientes con LPA⁷¹.

Se desconocen muchos aspectos de la apoptosis en la LPA y el SDRA; de hecho, muchos estudios son contradictorios en cuanto al beneficio o perjuicio en este tipo de pacientes. Existen muchas evidencias, sobre todo experimentales, sobre el importante papel que tienen los neutrófilos en la patogenia de la LPA y el SDRA. Es posible que el hipotético beneficio de la manipulación de la apoptosis en la patología pulmonar grave dependa del tipo de células afectadas y del momento de la evolución del daño pulmonar. Son necesarios más estudios que permitan conocer los aspectos fisiopatológicos de la apoptosis en la LPA y en el SDRA para, en un futuro, plantearse aplicar terapias específicas a estas patologías.

Sistema cardiovascular

Se ha demostrado, tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales *in vivo*, que se produce apoptosis en los miocitos tras un infarto agudo de miocardio (IAM), especialmente en la periferia de un

IAM donde la isquemia ha sido menor⁷². El manejo precoz del IAM con trombolíticos o angioplastia restaura el flujo sanguíneo y minimiza la necrosis miocárdica. Sin embargo, en la reperfusión miocárdica se libera una gran cantidad de radicales libres que producen muerte celular por apoptosis. De hecho, diversos trabajos experimentales han demostrado que el uso de bloqueadores de la apoptosis mejora el pronóstico en el IAM. Así, Parsa et al mostraron que el uso de eritropoyetina en cultivos *in vitro* de cardiomiocitos y administrado en conejos *in vivo* disminuía la apoptosis de los cardiomiocitos y con ello la extensión del IAM, con lo que se mejoraba la función ventricular⁷³. Nuevos estudios experimentales han confirmado dichos resultados⁷⁴. Es posible que en un futuro el mejor conocimiento de los mecanismos apoptóticos permita disminuir el daño producido tras la reperfusión miocárdica.

En los vasos sanguíneos, además de la importancia que la apoptosis pueda tener en el remodelamiento vascular, se han realizado estudios en la aterosclerosis. Las células inflamatorias y los miofibroblastos que se observan en la placa de ateroma pueden eliminarse mediante apoptosis. Es posible que una apoptosis mal regulada en la zona de ateroma contribuya a la progresión de la enfermedad⁷⁵.

Sistema gastrointestinal

El intestino es, en teoría, susceptible a cambios apoptóticos dada su elevada tasa de recambio celular. De forma tradicional se ha considerado que la integridad del epitelio intestinal tiene un papel muy importante en la sepsis evitando la translocación bacteriana⁷⁶. Estudios experimentales con ratas han demostrado la existencia de apoptosis en el epitelio intestinal. Mas aún, en modelos de sepsis la tasa de apoptosis se incrementa observándose un pico de apoptosis máximo en las primeras 24 horas tras el inicio de la infección. El aumento en la apoptosis se produce mediante la activación de la vía mitocondrial, dado que se ha observado que en ratones transgénicos la sobreexpresión de Bcl-2 disminuye la apoptosis intestinal⁷⁷ y mejora la supervivencia²⁸. Asimismo, en estudios con ratas sometidas a neumonía por *Pseudomonas aeruginosa* la sobreexpresión de Bcl-2 a nivel intestinal incrementa la supervivencia asociándose a un descenso de la apoptosis intestinal²⁹. Hotchkiss et al demostraron en una serie de pacientes fallecidos en una UCI que la tasa de apoptosis intestinal era muy superior en los pacientes fallecidos por sepsis respecto a los fallecidos por otras causas¹⁸. No obstante, los estudios realizados, sobre todo en seres humanos, son todavía muy limitados.

Sistema renal

Aunque la necrosis es el principal mecanismo de muerte celular en el fracaso renal agudo (FRA), la muerte por apoptosis también desempeña un papel

importante⁷⁸. Estudios experimentales han demostrado la existencia de apoptosis en el túbulo renal, tanto en la fase de hipoxia como en la de reperfusión renal⁷⁹. Además, se ha evidenciado apoptosis en los túbulos renales en biopsias de pacientes fallecidos con FRA⁸⁰. El número de células apoptóticas debido a la fase de reperfusión renal se correlacionaba con la duración de la isquemia renal⁸¹. En injertos renales, obtenidos de cadáver, se ha observado que tras la lesión por isquemia y reperfusión se produce apoptosis en los túbulos renales mediante la activación de la vía mitocondrial (se observó un incremento en la expresión de Bax en el 100% de las muestras estudiadas). La tasa de apoptosis se correlacionó con el tiempo de isquemia fría⁸². Otros autores han demostrado que la tasa de apoptosis en las células del túbulo renal de los injertos renales de cadáver son un factor predictivo para la función precoz del riñón postransplante⁸³. Asimismo, la disminución en la expresión de Bcl-2 en la biopsia del túbulo proximal del donante se asocia con peor función del injerto en el paciente trasplantado⁸⁴. En enfermos críticos se ha demostrado apoptosis del túbulo renal asociada a sepsis mediante la activación del receptor de membrana del TNF y la posterior activación de la ruta de las caspasas⁸⁵. En modelos experimentales se ha demostrado que fármacos nefrotóxicos como la gentamicina o quimioterápicos pueden producir apoptosis tanto en el túbulo proximal como en el distal⁸⁶.

POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS BASADAS EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

En la base de la patogénesis de cualquier enfermedad humana es frecuente que aparezca un componente apoptótico que contribuya a la progresión de la enfermedad. Por tanto, la modulación de la apoptosis como tratamiento tiene un gran potencial terapéutico. Modular la expresión de los componentes moleculares claves de la maquinaria apoptótica es una estrategia obvia mediante terapia génica. De hecho, se está estudiando la inhibición de la expresión génica con oligonucleótidos antisentido y el uso de moléculas biológicas recombinantes, sobre todo en el área de la Oncología. Sin embargo, tienen un gran número de limitaciones prácticas, especialmente en el campo de la Medicina Intensiva. El papel de la apoptosis está aún pendiente de establecerse con claridad y los procedimientos terapéuticos están en sus inicios.

En patología crítica se están utilizando diferentes fármacos que suelen tener a las caspasas como dianas terapéuticas. Se han realizado numerosos estudios experimentales con inhibidores de caspasas. En distintos modelos de isquemia (hepática, cardíaca, renal, intestinal y cerebral) la inhibición de caspasas ha resultado positiva, ya que además de disminuir la apoptosis ha mejorado la supervivencia y la función del órgano. Sin embargo, existen resultados contradictorios que demuestran que el bloqueo indiscriminado de caspasas puede empeorar el pronóstico³².

Son muy prometedores los estudios en daño cerebral traumático, hemorrágico o isquémico, donde se ha evidenciado el papel decisivo que tiene la familia de Bcl-2 en el pronóstico del DCA, tanto en animales como en seres humanos. Sin embargo, todavía no se han demostrado en estos últimos los excelentes resultados obtenidos mediante la inhibición neuronal de apoptosis en diferentes modelos experimentales.

La modulación de la apoptosis ofrece unas enormes posibilidades terapéuticas en el campo de la Medicina Intensiva. Aun así, actualmente existen muchas limitaciones prácticas que dificultan su desarrollo. El conocimiento del papel que desempeña la apoptosis en la patología crítica es incompleto. Se comienzan a conocer las consecuencias que se producen al incrementar o disminuir la apoptosis en diferentes órganos; sin embargo, no está aclarado si dicho incremento o disminución son beneficiosos o perjudiciales. La modulación de la apoptosis debe ser adecuada en cada momento según las necesidades del órgano afectado. Además, para poder conseguir un efecto terapéutico beneficioso, la modulación apoptótica debe ser organoespecífica. Una activación indiscriminada de la apoptosis puede resultar perjudicial para varios órganos e incluso inducir la aparición de tumores. Por otra parte, la supervivencia de una célula por la inhibición de apoptosis no significa el mantenimiento de la función celular. Es posible que la inhibición de la apoptosis celular produzca una célula no funcional.

Sin duda alguna, nos encontramos en los inicios de una nueva posibilidad terapéutica en el campo de la Medicina Intensiva. En los años sucesivos se desarrollarán nuevos estudios que permitirán dilucidar el papel que puede tener la apoptosis en el paciente crítico.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Álvaro Castellanos (Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla) por su ayuda en la revisión de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Magno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
2. 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.
3. Martin SJ, Matear PM, Vyakarnam A. HIV-1 infection of human CD4+ T cells *in vitro*. Differential induction of apoptosis in these cells. *J Immunol* 1994;152:330-42.
4. Hettis SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;279:300-7.
5. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 1998;17:3207-13.
6. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel D. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845-53.
7. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 2003;4:404-9.

8. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates and apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
9. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model of caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273:2926-30.
10. Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpa1) death signal. *J Biol Chem* 1998;273:4345-9.
11. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998;17:3237-45.
12. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17:3225-36.
13. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carrillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101:1644-55.
15. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
16. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002;168:2493-500.
17. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001;16:83-96.
18. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-51.
19. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, López-Rodríguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
20. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:11199-203.
21. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2002;30 (Suppl 5):225-8.
22. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002;9:6-19.
23. Heasman SJ, Giles KM, Ward C, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol* 2003;178:29-36.
24. Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, López BL, Christopher TA, et al. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002;105:1497-502.
25. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2000;345:1359-67.
26. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14541-6.
27. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999;162:4148-56.
28. Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Stromberg PE, Buchman TG, et al. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med* 2002;30:195-201.
29. Coopersmith CM, Stromberg PE, Dunne WM, Davis CG, Amiot DM, Buchman TG, et al. Inhibition of intestinal epithelium apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA* 2002;287:1716-21.
30. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003;20:208-12.
31. Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, et al. Interleukin-10 counter-regulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997;90:3356-63.
32. Cauwels A, Janssen B, Waeytens A, Cuvelier C, Brouckaert P. Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* 2003;4:387-93.
33. Murphy FJ, Hayes I, Cotter TG. Targeting inflammatory diseases via apoptotic mechanisms. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:412-9.
34. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453-501.
35. Rose CD, Henneberry RC. Mechanisms of programmed cell death and their implications for the brain. *Neurodegeneration* 1993;2:287-98.
36. Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical demonstration of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1996;137:1337-45.
37. Smale G, Nichols NC, Brady DR, Finch CE, Horton WE. Evidence of apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1995;133:225-30.
38. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and control of cell survival: lessons from the nervous systems. *Science* 1993;262:695-700.
39. Bredesen DE. Neuronal apoptosis genetic and biochemical modulation. En: *Apoptosis II, the molecular basis of apoptosis in disease*. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994; p. 397-421.
40. Rink A, Fung KR, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 1995;147:1575-83.
41. Smith FM, Raghupathi R, Mackinnon MA, McIntosh TK, Saatman KE, Meaney DF, et al. TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta Neuropathol* 2000;100:537-45.
42. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, et al. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J* 1999;13:813-21.
43. Raghupathi R, Fernández SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, et al. Bcl-2 overexpression attenuates cortical cell loss following traumatic brain injury in transgenic mice. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 1998;18:1259-69.
44. Nakamura M, Raghupathi R, Merry DE, Scherbel U, Saatman KE, McIntosh TK. Overexpression of Bcl-2 is neuroprotective after experimental brain injury in transgenic mice. *J Comp Neurol* 1999;412:681-92.
45. Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR. Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery* 2000;46:949-56.
46. Felderhoff-Mueser U, Siffringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, et al. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2002;11:231-45.
47. Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, et al. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience* 2002;110:605-16.
48. Raghupathi R, Strauss KI, Zhang C, Krajewski S, Reed JC, McIntosh TK. Temporal alterations in cellular Bax:Bcl-2 ratio following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 2003;20:421-35.
49. Wennersten A, Holmin S, Mathiesen T. Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003;105:281-8.
50. McKeating EG, Andrews PJ, Signorini DF, Mascia L. Transcranial cytokine gradients in patients requiring intensive care after acute brain injury. *Br J Anaesth* 1997;78:520-3.

51. Miñambres E, González C, Cemborain A, Sánchez-Velasco P, Gandarillas M, Leyva-Cobian F, et al. Systemic and internal jugular serum levels of interleukin-6 after acute brain injury. *Intensive Care Med* 2000;26: S282.
52. Miñambres E, Cemborain A, Sánchez-Velasco P, Gandarillas M, Díaz-Regañón G, Sánchez U, et al. Correlation between transcranial interleukin-6 (IL-6) gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit Care Med* 2003;31:933-8.
53. Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH. Cellular accumulation of extravascular serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotrauma* 1998;15:825-35.
54. Miñambres E. Inducción de apoptosis celular en pacientes con daño cerebral agudo como mecanismo de producción de fenómenos autoinmunes. Tesis Doctoral. Santander, Junio 2002.
55. López-Escribano H, Miñambres E, Labrador M, Bartolomé MJ, López-Hoyos M. Induction of cell death by sera from patients with acute brain injury as a mechanism of production of autoantibodies. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46:3290-300.
56. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4044-9.
57. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 2003;198:971-5.
58. Knoblach S, Fan L, Huang X. Activation of caspase 3 and 9 after traumatic brain injury in the rat: treatment with a pan-caspase inhibitor improves outcome. *Society for Neuroscience* 2000; 26:2300.
59. Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, et al. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1071-6.
60. Ware LB, Matthay MA. Acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-49.
61. Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S184-8.
62. Abraham E. What role does neutrophil apoptosis play in acute respiratory distress syndrome? *Crit Care Med* 2000;28:253-4.
63. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S195-9.
64. Hart SP, Dougherty GJ, Haslett C, Dransfield I. CD44 regulates phagocytosis of apoptotic neutrophil granulocytes, but not apoptotic lymphocytes, by human macrophages. *J Immunol* 1997;159:919-25.
65. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, et al. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 2002; 296:155-8.
66. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, et al. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000;28: 1-7.
67. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1250-7.
68. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1376-83.
69. Bachofen A, Weibel ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1982;3:35-56.
70. Guinee D, Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, et al. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *AM J Pathol* 1997; 151: 999-1007.
71. Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* 2002;161:1783-96.
72. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nishihara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-41.
73. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112:999-1007.
74. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11612-7.
75. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liu G. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995;147:267-77.
76. Husain KD, Coopersmith CG. Role of intestinal epithelial apoptosis in survival. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:159-63.
77. Coopersmith CM, Stromberg PE, Davis CG, Dunne WM, Amiot DM, Karl IE, et al. Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest. *Crit Care Med* 2003;31:1630-7.
78. Ueda N, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med* 2000;108:403-15.
79. Supavekin S, Zhang W, Kuchelapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003;63:1714-24.
80. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:301-8.
81. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 872-6.
82. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003; 76: 50-4.
83. Oberbauer R, Rohrmoser M, Regele H, Muhlbacher F, Mayer G. Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2006-13.
84. Schwarz C, Hauser P, Steininger R, Regele H, Heinze G, Mayer G, et al. Failure of BCL-2 up-regulation in proximal tubular epithelial cells of donor kidney biopsy specimens is associated with apoptosis and delayed graft function. *Lab Invest* 2002;82: 941-8.
85. Kiyokawa N, Taguchi T, Mori T, Uchida H, Sato N, Takeida T, et al. Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* Shiga toxins 1 and 2. *J Infect Dis* 1998;178:178-84.
86. Lydon A, Martyn JA. Apoptosis in critical illness. *Int Anesthesiol Clin* 2003;41:65-77.