
REVISIÓN DE TEMAS CARDIOLÓGICOS

Detección de apoptosis en enfermedades cardiovasculares mediante las imágenes SPECT de cardiología nuclear

David Bialostozky,* Gerardo Rodríguez-Diez,** Cecilia Zazueta***

Resumen

La apoptosis es un proceso biológico de muerte o suicidio celular presente en todas las células de los metazoarios. Mantiene un equilibrio entre la regeneración de las células pluripotenciales o células madre y la eliminación de células que ya han servido su propósito, que se han reproducido en exceso, o en las que existe daño genético irreparable. La activación de la apoptosis en cardiomiocitos es un problema común en una gran variedad de cardiopatías y se ha sugerido que contribuye de manera importante a la dilatación ventricular y al aumento del tamaño del infarto en pacientes con insuficiencia cardíaca y con enfermedad cardiovascular. El diagnóstico clínico de la apoptosis es una realidad en la ciencia médica, cuya aplicación en diferentes facetas de la Cardiología, incluye desde la cardiopatía coronaria hasta los trastornos del ritmo. En este sentido, el uso de la imagenología no-invasiva, puede ser de gran utilidad para la detección *in vivo* de este tipo de muerte celular, en pacientes con necrosis miocárdica, con isquemia miocárdica aguda, con rechazo agudo del trasplante cardíaco, con miocarditis, con tumores malignos intracardíacos, así como en casos de cardiotoxicidad y de otras cardiomiopatías. Particularmente la unión de la Anexina V, marcada con Tc99m produce imágenes gammagráficas que permiten la identificación de células apoptóticas *in vivo*, en sistemas con el SPECT y SestaMiBi. En resumen, la utilización de estas técnicas será invaluable en un futuro próximo

Summary

APOPTOSIS DETECTION IN CARDIOVASCULAR DISEASES THROUGH NUCLEAR CARDIOLOGY SPECT IMAGES

Apoptosis is a biological process of death or cellular suicide present in all the cells of the metazoans. It maintains the balance between the regeneration of pluripotential cells -or stem cells- and the elimination of cells that have already served their function, of cells that have reproduced in excess, or have been genetically damaged beyond repair. Apoptosis activation in cardiomyocytes is a common problem in a large variety of cardiomyopathies; it has been suggested that it is an important contributor ventricular hypertrophy and to the increase of the infarct size in patients with cardiac failure and cardiovascular disease. Clinical diagnosis of apoptosis is a reality in the medical science, its application in different aspects of cardiology includes from coronary cardiopathy to rhythm alterations. In this sense, the use of the non-invasive imaging, can be very useful for the *in vivo* detection of this type of cellular death in patients with myocardial necrosis, acute myocardial infarct, acute rejection of cardiac transplantation, myocarditis, intracardial malignant tumours, as well as in cardiotoxicity cases and other cardiomyopathies. Particularly, binding of Tc99m-labeled Annexin V, produces gammagraphic images that allow the identification of apoptotic cells *in vivo* in SPECT and SestaMiBi systems. In summary, the use of these techniques will be

* Departamento de Cardiología Nuclear del Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", México, D.F.

** Subsección de Arritmias del Hospital Central Militar, México, D.F.

*** Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", México, D.F.

Correspondencia: David Bialostozky. Departamento de Medicina Nuclear, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH, Juan Badiano Núm. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, D.F.)

Recibido: 7 de diciembre de 2005

Aceptado: 9 de julio de 2007

para la terapia e intervención anti-apoptosis en la rutina de la Cardiología diaria.

invaluable in the near future for anti-apoptosis therapy and intervention in the routine of the daily Cardiology practice.
(Arch Cardiol Mex 2008; 78: 217-228)

Palabras clave: Apoptosis miocárdica. Cardiología nuclear. Imagenología no invasiva.

Key words: Apoptosis. Nuclear cardiology. Non-invasive imaging.

Introducción

La apoptosis miocárdica es un proceso de muerte o "suicidio" celular que en los últimos años ha despertado gran interés por su interacción en múltiples patologías, tales como la insuficiencia cardíaca, el daño agudo por isquemia-reperfusión, o la ruptura de las placas ateromatosas lo que en última instancia lleva a eventos coronarios agudos.¹⁻⁷ La apoptosis es un proceso biológico que está presente en los organismos celulares, y que se realiza con base a los requerimientos fisiológicos del individuo, manteniendo el equilibrio que la naturaleza establece a través de la regeneración de las células pluripotenciales o células madre.⁸ Este tipo de balance permite la eliminación de células que ya han servido con su propósito, que se han reproducido en exceso, o en las que existe daño genético irreparable.^{1,7,8}

Diferentes patologías muestran alteraciones en los mecanismos de apoptosis en virtud de una disfunción, sea excesiva o bien deficiente; por ejemplo, la falta o deficiencia de la apoptosis se asocia con proliferación celular exagerada en las enfermedades oncológicas, la apoptosis excesiva lleva a una pérdida progresiva de tejido funcional como sucede en la insuficiencia cardíaca y en la enfermedad de Alzheimer y finalmente, la disminución de la apoptosis aparece en las enfermedades autoinmunes, en las cuales, existe sobrevivencia de células inmunológicamente competentes contra antígenos propios que producen daño en los órganos blanco.^{1,5,7,8}

La medicina nuclear permite obtener imágenes de diferentes procesos biológicos, de la función de algunos receptores o de las interacciones moleculares, tanto en los animales como en los seres humanos. Estas técnicas han permitido incrementar nuestro conocimiento en la fisiopatología de enfermedades diversas y así de esta manera se han desarrollado estrategias especializadas con el fin de identificar la apoptosis.¹

Muerte celular programada y apoptosis

Virchow en 1858 observó en las placas ateroscleróticas, células que se replicaban y posteriormente morían a través de un sistema de muerte programada,⁸ pero fue Kerr⁹ quien en 1972 definió y utilizó la palabra griega apoptosis, la cual describe la "caída en otoño de las hojas de los árboles y de los pétalos de las flores", para referirse a la peculiar semejanza morfológica con este tipo de muerte celular. El término apoptosis comúnmente se utiliza como sinónimo de muerte celular programada ya que en ocasiones la célula muere como resultado de la activación regulada de un programa preexistente de "suicidio celular" que es controlado internamente y codificado en el genoma, para poder eliminar a las células no deseadas, con mínima desorganización de las estructuras tisulares circunvecinas.^{10,11} Este mecanismo selectivo ocurre en los procesos de desarrollo y de maduración como en la embriogénesis, en la metamorfosis, en la atrofia tisular o en la selección celular. Las células que mueren han sido programadas genéticamente para entrar en apoptosis en un momento determinado en todos los individuos de esa especie.^{5,8} Pero la apoptosis, en otras etapas de la vida, también puede ser inducida por factores externos debido a procesos fisiológicos o no-fisiológicos, que al generar sustancias tales como las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) o mediadores químicos, lesionan a las células alterando de manera irreversible su función. En estas circunstancias la célula activa un proceso de autoeliminación a través de la apoptosis, sin que ésta haya sido programada por necesidad genética.^{7,11} Por lo tanto, la muerte celular programada y la apoptosis no deben ser utilizadas como términos equivalentes, ya que pueden ocasionar confusiones en relación con los mecanismos fisiopatológicos que la inducen.^{11,12}

Características de la apoptosis

La apoptosis se caracteriza por la muerte celular que ocurre en ausencia de inflamación en las células o en los tejidos contiguos, y se define por las características morfológicas que a continuación se describen:¹¹⁻¹⁴

- 1) En el núcleo inicialmente se produce una fragmentación ordenada de cadenas internucleosomales de ADN, entre 180 y 200 bp (pares de bases), o múltiplos y submúltiplos de éstos. El citoplasma y la cromatina nuclear se condensan y se compactan agrupándose en el extremo del núcleo celular (dando la apariencia de media luna), para degenerar en los cuerpos apoptóticos que contienen los restos de los organelos (mitocondria, membrana sarcoplásmica y restos nucleares). Además la membrana nuclear "se arruga" formando zeiosis (vesículas de la misma membrana que tienen citoplasma denso).
- 2) La integridad de la membrana celular nunca se pierde y por consiguiente, no hay liberación de los detritos celulares al espacio extracelular, ni tampoco estímulos inflamatorios. Estas características

impiden la detección de la apoptosis en la sangre circulante y obligan a la búsqueda de otros mecanismos para su identificación.

- 3) La organización de los fosfolípidos en la mayoría de los tipos celulares cambia tras la inducción de apoptosis. La fosfatidilserina (PS), que en las membranas de las células normales se localizan en la lamela citoplásmica, se transloca a la lamela extracelular quedando expuesta sobre la superficie celular, representando un estímulo para la fagocitosis. La detección *in vitro* de la PS expuesta se consigue a través de su interacción con el anticoagulante Anexina V, que en presencia de calcio incrementa su afinidad por la PS produciéndose una rápida unión. La anexina V puede estar marcada con biotina, o con algún marcador fluorescente, de modo que es posible detectar su unión en los tejidos o en las células aisladas por citometría de flujo o por microscopía de fluorescencia. En la cardiología nuclear se ha utilizado como un excelente marcador para visualizar la apoptosis *in vivo* (Fig. 1).
- 4) En la fase terminal, las células apoptóticas y los fragmentos remanentes son fagocitadas

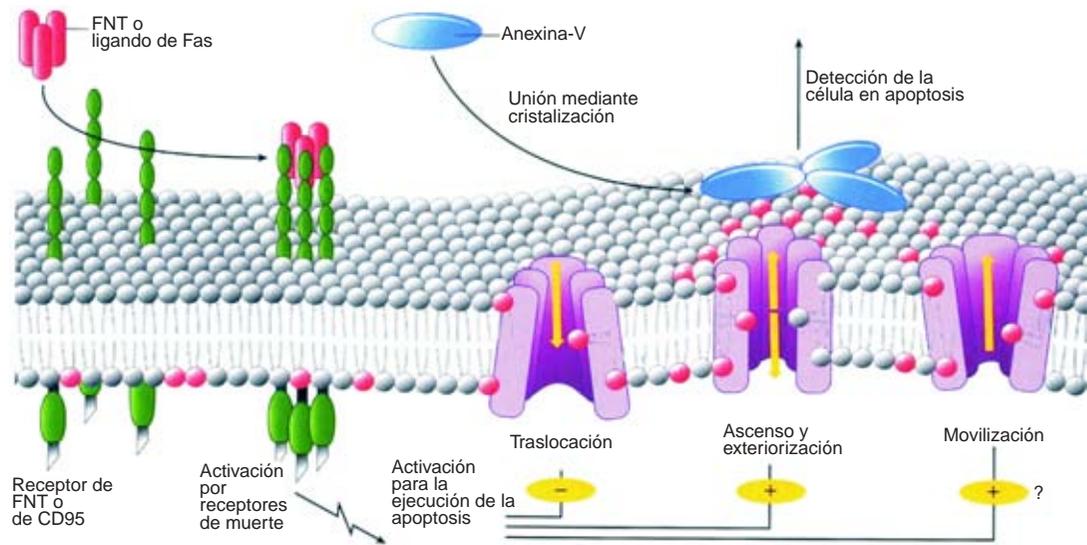


Fig. 1. Mecanismo de detección de la muerte celular programada con anexina V como marcador. El factor de necrosis tumoral (FNT) o el ligando de Fas/CD95 inician la activación del programa de muerte celular. Ambos factores activan un proceso de señalización que conduce a la muerte. Se activa el ejecutor de la apoptosis y paralelamente hay traslocación de la fosfatidilserina (PS) de la lamela interna a la externa por acción de una escramblasa y de una flipasa. La activación del programa permite la externalización de la fosfatidilserina (PS) que es reconocida por la anexina V (Annexin A5), esto permite identificar a la célula apoptótica.

Figura obtenida de: Hofstra L, Reutenligsperger C, Kietselaer B, Narula J, Strauss HW. Noninvasive Detection of Cell Death in Myocardial Disorders. In Clinical Nuclear Cardiology. Zaret BL, Beller GA. 3rd Ed Elsevier Mosby. 2005. pp. 650 y 653

por células del sistema retículo-endotelial o bien por las células contiguas.

Diferentes tipos de muerte celular

En general, la muerte celular puede ser producida por necrosis o apoptosis, y también por otras formas de muerte celular que constituyen procesos intermedios. En la apoptosis la célula dirige por sí misma su programa de muerte, ya sea porque fue determinada genéticamente o porque fue activada por señales originadas del exterior; tales como: la deficiencia de nutrientes incluyendo el oxígeno, las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), el estrés de rozamiento celular ("shear stress"), la radiación ultravioleta o bien algunas drogas.^{5,11} En cambio, en la necrosis el proceso anatómico-fisiológico es totalmente diferente: la ruptura del ADN ocurre en forma desordenada y al azar, la membrana celular es lesionada de manera súbita por causas mecánicas, térmicas o químicas produciendo desnaturalización de las proteínas, daño nuclear y finalmente edema celular con pérdida de la integridad de la membrana, liberando residuos y sustancias celulares al intersticio, lo cual provoca más inflamación y después formación de la cicatriz.^{13,15} Las células necróticas y sus organelos se edematizan y desde las primeras etapas hay daño en la membrana, aglutinación en el núcleo y lisis en la cromatina nuclear.^{5,7} En general se podría decir que la necrosis es producto de estímulos inesperados y muy potentes como la isquemia aguda, la hipoxia aguda asociada al infarto, la inflamación y la infección, que afecta indistintamente y en forma súbita a un grupo o a otros grupos celulares; en cambio la apoptosis es un proceso paulatino que finaliza en la muerte celular individual sin alterar la estructura de las células vecinas.^{7,8}

Como se dijo anteriormente existen además otras vías que pueden inducir apoptosis, las cuales aún no están completamente definidas, como de la muerte celular "parecida a la apoptosis" ("*apoptosis like*") o "parecida a la necrosis" ("*necrosis like*") por presentar características que se inclinan en uno u otro sentido.^{11,12} Otro tipo de muerte es la autofágica, de particular interés en la cardiología, dado que se le implica en el mecanismo de muerte celular observado en la insuficiencia cardíaca, donde hay formación de vacuolas citosólicas que liberan enzimas lisosomales que destruyen rápidamente a las células, generando inflamación por las sustancias que liberan.^{16,17}

Vías de activación de la apoptosis

Independientemente del estímulo que induce a la apoptosis, los mecanismos confluyen en una vía común. La mayoría de los cambios morfológicos, tales como la fragmentación nuclear y de las proteínas celulares, son causados por las caspasas (Cysteine Aspartyl Specific Proteases).^{12,18} Las caspasas, son parte de la familia de las cisteína-proteasas, sintetizadas como proenzimas inertes denominadas zimógenos, que se activan por desdoblamiento proteolítico dando origen a unidades que llevan a cabo la fragmentación ordenada de las proteínas celulares y del ADN.¹⁸⁻²⁰ Se conocen hasta ahora 14 caspasas que se subdividen en dos grandes grupos de acuerdo a su función; iniciadoras, como la ocho y la nueve y las efectoras, como la tres, seis y la siete, las cuales son dependientes de las iniciadoras para poder ejercer su función.^{11,14}

La activación de la apoptosis mediante las caspasas se ejecuta a través de una vía común activando la caspasa 3. Se pueden utilizar dos rutas, no excluyentes entre sí:²¹ una vía extrínseca o Tipo I, a través de receptores situados en la membrana celular llamados receptores celulares de muerte (Death Cell Receptors), que pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (FNT) cuyos prototipos son *FAS* y su ligando *APO/FAS* y *TNRF1*^{14,22} o bien, mediante una vía intrínseca o Tipo II, mediante la liberación del activador mitocondrial del tipo citocromo C, que es translocado del espacio intermembranal al citosol, iniciando así la cascada de las caspasas.²¹⁻²⁴ Ambos mecanismos son vías que intervienen como mediadores de la apoptosis en los miocitos cardíacos.^{4,19}

Vía extrínseca

La señal extrínseca se inicia con la unión de un ligando de muerte a su receptor de superficie. Este puede ser una proteína integral de membrana en una segunda célula (e.g. FAS) o una proteína extracelular soluble (FNT- α o factor de necrosis tumoral- α). La unión del ligando se inicia con la formación de un complejo multiproteico llamado de señalamiento de inducción de muerte (Death Inducing Signaling Complex, DISC).^{25,26} Éste se une a una proteína adaptadora, denominada proteína con un dominio de muerte asociado a FAS (Fas-Associated Via Death Domain, FADD), que a su vez recluta a la procaspasa-8 a través de los dominios receptores de muerte. La consecuencia de esta unión es la ac-

tivación de la procaspasa-8, la que rompe y activa a la procaspasa-3 y a Bid, proteína pro-apoptótica del tipo Bcl-2, a través de la cual se unen las vías extrínseca e intrínseca de muerte celular (Fig. 2).²⁷

Vía intrínseca

A diferencia de la vía extrínseca, que traduce señales específicas de estímulos para la muerte celular, la vía intrínseca integra una amplia gama de agresiones extra e intracelulares. Dentro de los primeros se incluyen las deficiencias en nutrientes, las radiaciones y otros tipos de estrés químicos y físicos. A su vez en los estímulos intracelulares se incluyen estrés oxidativo, daño al ADN y plegamiento incorrecto de las proteínas. Todas estas señales convergen en la mitocondria llevándola a su disfunción y a la liberación de fragmentos apoptogénicos al citosol. Estas proteínas incluyen al citocromo C,²⁸ Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Derived Activator of Caspase/Direct IAP-Binding Protein),²⁹ Omi/HtrA2 (High Temperature Requirement Protein A2),³⁰ AIF (Apoptosis Inducing Factor)³¹ and EndoG (Endonuclease G).³²

Los mecanismos que permiten la liberación de estas moléculas están siendo estudiados, sin embargo, el que más atención ha recibido es el que se relaciona con la liberación del citocromo C. Por un lado, se ha sugerido que la liberación de citocromo C se lleva a cabo a través de canales que forman las proteínas pro-apoptóticas (e.g. BAX), después de oligomerizarse e insertarse en la membrana externa mitocondrial. También se ha propuesto que su acción es mediante la permeabilización de los lípidos de la membrana, mientras que otros estudios involucran al poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM). En condiciones normales este poro se mantiene cerrado, lo que permite que se lleve a cabo la fosforilación oxidativa acoplada al transporte de electrones. En condiciones de estrés (como el isquémico), el PTPM se abre permitiendo el libre paso de moléculas y la entrada de agua a la matriz, que trae como consecuencia el edema y expansión de la membrana interna y externa, que tiene una capacidad de expansión limitada. Como consecuencia de este edema, la externa se rompe y se liberarán al citosol, tanto el citocromo C, como otras proteínas apoptogénicas.

Una vez que el citocromo C es liberado, se une a la proteína adaptadora (APAF-1, Apoptotic Protease Activating Factor-1).³³ En presencia de ATP, esta proteína sufre un cambio en su conformación, lo que resulta en la formación de homo-oligómeros y en el reclutamiento de la procaspasa-9. El complejo así formado da como resultado una estructura conocida como el apoptosoma, el que atrapa y activa a la procaspasa-3. La caspasa-3, producto de la activación de la procaspasa-3, inicia la fase ejecutora de la apoptosis (Fig. 2).²⁷

La vía de las caspasas es el mecanismo de apoptosis más estudiado, sin embargo, éste también se puede llevar a cabo por otras vías, como sucede en la "muerte celular parecida a la apoptosis" o la "parecida a la necrosis", la muerte celular autofágica, o la "muerte celular negra" (dark cell death), la cual sucede de manera preferente en el sistema nervioso central y en los condrocitos.¹¹ Estos tipos de muerte celular pueden servir como un "sistema de respaldo" para llevar la muerte celular, dado que algunas de ellas pueden depender de la acción de las caspasas, demostrándose así la gran plasticidad que tiene el organismo en la eliminación celular.^{1,10,11}

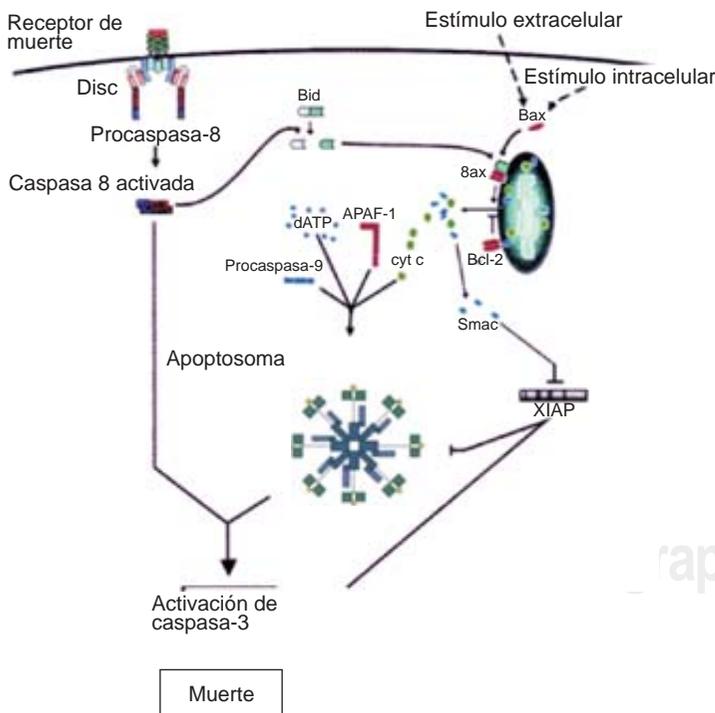


Fig. 2. Mecanismos de muerte celular. Vías intrínseca y extrínseca. Modificada de Crow M, Mani K, Nam, Kitsis R. *The Mitochondrial Death Pathway and cardiac myocyte apoptosis* *Circ Res* 2004;95:957-970

La apoptosis en el sistema cardiovascular

El desarrollo normal de muchos sistemas de órganos en mamíferos depende de la eliminación de células mediante apoptosis. Aunque la función precisa de la maquinaria apoptótica no se conoce en el corazón en desarrollo, existen evidencias experimentales de que la apoptosis participa de forma importante en la organogénesis cardíaca, ya que la mutación de genes como el de la caspasa 8, de FADD y de FLIP causa defectos cardíacos en modelos animales.

Por otra parte, la apoptosis interviene en la etiología y en la fisiopatología de numerosas enfermedades y juega un papel crucial en el sistema cardiovascular. Se le implica en alteraciones durante la formación del septum y de las estructuras valvulares y las vasculares. Aspectos que parecen depender de la intensidad, el tipo y la exposición al estímulo.³⁴⁻³⁶ La apoptosis también interviene en una amplia variedad de cardiopatías del adulto, incluyendo al infarto del miocardio, la miocarditis, las cardiomiopatías, el rechazo en el trasplante cardíaco y en la insuficiencia cardíaca.^{6,37-40}

La apoptosis miocárdica en la cardiopatía coronaria

En el infarto del miocardio los miocitos mueren tanto por necrosis como por apoptosis.^{2,6,37} Las células lesionadas oscilan entre el proceso de la necrosis y de la apoptosis sobre la base de su contenido intracelular de adenosina-trifosfato (ATP).⁴¹⁻⁴³ Esto ocurre durante los procesos de daño agudo y particularmente en las células diferenciadas terminales. La apoptosis es dependiente de energía en forma de ATP, en cambio la necrosis no lo es, por ejemplo, en el daño por reperfusión durante el infarto del miocardio, las células tratan de repararse, sin embargo, el proceso de consumo de energía aumenta considerablemente y repleta las reservas energéticas celulares forzando el camino hacia la apoptosis o a la necrosis.⁴¹⁻⁴³

Experimentalmente en el infarto agudo del miocardio, la apoptosis se presenta en las primeras dos a cuatro horas, siendo de mayor cuantía entre las seis y las 24 horas. En la zona infartada alcanza extensiones entre el 5 y el 30% y se completa en las primeras 24 h.^{2,10,11,37} En la remodelación ventricular izquierda, la apoptosis del miocardio remoto se inicia dentro de las primeras horas a días y continúa por meses, alcanzando estimados de muerte celular en el orden del 1% diario y con duración

que oscila entre los 10 y 62 días.^{19,38} Además, dicho proceso se puede realizar por relación célula a célula (por deslizamiento), extendiendo aún más el área del infarto.^{2,10,11,19}

La apoptosis de los cardiomiocitos, desempeña un papel importante en la zona infartada así como también en el miocardio remoto, como sucede en la insuficiencia cardíaca post infarto, la cual puede ser consecuencia de pérdida aguda de miocitos en la zona infartada, aunque, con mayor frecuencia, es precipitada por la lenta y progresiva remodelación ventricular.³⁸ En la cardiopatía isquémica coronaria la pérdida de los miocitos es la causa más importante que ocasiona la falla cardíaca. En el borde del infarto ocurre cierta regeneración temporal, con una etapa inicial de estabilidad, siendo mínima la movilización, la destrucción y la regeneración de las células. Pero, con el tiempo las células que no se reparan mueren por apoptosis, mecanismo muy importante en la transición de la enfermedad, dado que puede precipitar en ocasiones la insuficiencia cardíaca.^{17,43}

Dentro de los estímulos responsables de inducir apoptosis en los miocitos está el binomio isquemia/reperfusión,^{2,44} la sobrecarga de presión,¹⁰ los factores neurohumorales (como las catecolaminas), las toxinas, las citocinas pro-apoptóticas como el TNF- α y el ligando de Fas/CD95, además de algunas drogas utilizadas en la quimioterapia, como los antracíclicos.^{7,8,11,34}

Existe una correlación directa entre la tasa de apoptosis, tanto en la zona infartada como en el tejido del miocardio remoto, con los signos de remodelación post infarto, con el consecuente adelgazamiento de la pared, la dilatación ventricular y la presencia clínica de la insuficiencia cardíaca. Abbate y cols. estudiaron 14 enfermos que fallecieron como consecuencia de insuficiencia cardíaca secundaria a infarto del miocardio transmural extenso, con 10 a 62 días de evolución (16 como promedio) y con enfermedad coronaria multivasculosa. La mitad había tenido el infarto seis meses antes, sin reinfarcto inmediato. En estas circunstancias, el miocardio se hipertrofia en respuesta a la sobrecarga de volumen y a señales neuro-hormonales, con lo cual inicialmente disminuye la presión sobre la pared ventricular, mas posteriormente el ventrículo se dilata y las paredes disminuyen de grosor resultando en un deterioro en la función ventricular.^{38,39} Experimentalmente se ha demostrado que la inhibición de la apoptosis de los

miocitos, tanto por métodos genéticos como farmacológicos disminuye el tamaño del infarto, la dilatación ventricular y la mortalidad.⁴³⁻⁴⁶

La apoptosis contribuye también en la enfermedad focal del endotelio, de la túnica media y la adventicia tanto en las coronarias pequeñas y las mayores, e involucra de forma concomitante a los miocitos, a las pequeñas arterias coronarias locales, a las estructuras neurales y los fibroblastos.⁴⁷

La proliferación celular juega un papel crítico en la acumulación anormal de las células a nivel de la íntima y en la formación de las lesiones vasculares. También la muerte celular es factor predominante en la aterosclerosis y en la reestenosis post angioplastia. Los genes reguladores de la apoptosis tales como el bcl-x son determinantes en la formación de la lesión de la íntima, por lo cual el control de la apoptosis resulta una terapia del futuro para la enfermedad de la íntima vascular.⁴⁸

Existe un gran interés en la investigación del rescate del miocardio que se lesiona con la isquemia, mediante la regeneración con las células del tallo,⁴⁰ así como por la replicación de los miocitos.⁴⁹⁻⁵¹

La apoptosis en el sistema de conducción cardíaca

Durante la embriogénesis, las alteraciones en la apoptosis pueden producir enfermedades congénitas tales como el síndrome de WPW en las bandas del músculo accesorio por debajo de la aurícula y del ventrículo,³⁵ y también bloqueo A-V congénito por excesiva apoptosis en la vía de conducción cardíaca.^{35,36}

En su vida intrauterina el ventrículo derecho mantiene un tamaño y grosor semejante al del izquierdo, sin embargo, al nacer hay una involución normal que es mediada por apoptosis.³⁴ Sin embargo, este proceso benéfico puede no continuar hacia la evolución normal y ser causa de padecimientos congénitos del sistema de conducción y de los vasos sanguíneos.³⁶ Dicha alteración mediada por la apoptosis juega un papel importante en relación con los síndromes de Brink⁵² y de Brugada.⁵³ El síndrome de Brink, es un proceso genético en familias de Sudáfrica que se ha asociado con apoptosis selectiva con la gradual destrucción del nodo sinusal, del nodo AV (sin abarcar el haz de His), y de los miocitos del septum interatrial, principalmente en los sistemas de conducción internodales.^{36,52} Una al-

teración semejante aparece en el síndrome de Brugada (en el cual se observa en el ECG imagen sugestiva de bloqueo avanzado de la rama derecha del haz de His y elevación característica del segmento ST en precordiales derechas de V1 a V3) con predisposición para desarrollar arritmias malignas (taquicardia ventricular helicoidal o fibrilación ventricular) y causar muerte súbita.^{10,53}

El síndrome del QT largo, descrito por Jervell⁵⁴ es un proceso genético con afección en los canales celulares que puede o no acompañarse de sordera pero con propensión a la muerte súbita por arritmias malignas, sin aparente enfermedad del corazón, excepto por degeneración focal no inflamatoria de gran parte del nodo sinusal y cardioneuropatía local intranodal y perinodal. La degeneración y destrucción de las células del nodo sinusal, tanto de los miocitos como de las estructuras neurales es mediado por apoptosis focal, microcondriosis pleomórfica y ausencia de necrosis.^{54,55} En enfermos de riesgo alto (sordera, síncope, reanimación de paro cardíaco, antecedentes de muerte súbita familiar, o síndrome de QT largo tipo 3), la colocación del desfibrilador automático implantable (DAI), ha mejorado su sobrevivencia.^{34,54,55}

La anomalía de Uhl,⁵⁶ de etiología desconocida se caracteriza por destrucción casi total del VD; los sujetos fallecen por insuficiencia ventricular derecha. Dicha destrucción está mediada por apoptosis, sin abarcar las otras cavidades del corazón.^{36,56}

La displasia arritmogénica del VD se caracteriza por múltiples sitios de degeneración fibro-grasosa, principalmente a nivel del tracto de salida, la cual al parecer es producto de la apoptosis.^{57,58}

En las miocardiopatías

En general se considera que la apoptosis juega un papel importante en éstas; sin embargo, cuando éstas evolucionan con deterioro rápido y caída en insuficiencia cardíaca intervienen otros factores, tales como aumento de las citocinas circulantes, la disminución de los mecanismos de defensa por infección y la activación de los sistemas de inflamación, inmunológicos y neurohormonales.^{17,59} En 26 enfermos con miocardiopatía dilatada idiopática con insuficiencia cardíaca (moderada a severa), la biopsia del miocardio demostró la presencia de procesos activos de reparación miocárdica con escasa apoptosis.⁶⁰

Identificación de apoptosis "in vivo"

La prevención de la lesión, así como la intervención temprana continúa siendo la base primordial en el manejo de la enfermedad miocárdica y es ahí donde el estudio diagnóstico de la apoptosis puede aportar importantes beneficios, siendo necesarias estrategias especializadas con el fin de identificarla antes de su desarrollo hacia etapas que son irreparables.^{1,61,62} Es factible detectar la necrosis miocárdica desde muy temprano a través de la medición de sustancias mio-celulares liberadas a la circulación por la destrucción de la apoptosis la membrana celular (marcadores bioquímicos).⁶³ En cambio, durante el proceso de apoptosis la membrana celular permanece intacta y por lo tanto, no se liberan estos contenidos intracelulares. Durante la muerte celular apoptótica, como resultado de las alteraciones enzimáticas se presenta la pérdida de la simetría de los fosfolípidos dentro de la doble capa del sarcolema con exteriorización de la fosfatidilserina (PS).⁶⁴ Ya que los macrófagos poseen receptores para la PS, cuando ésta se expone en la membrana celular es removida junto con los cuerpos apoptóticos.^{11,64}

Se cree que la exteriorización de la PS depende de la activación de una lipasa y de una translocasa de aminofosfolípidos dependiente de ATP, la detección de la fosfatidilserina está basada en la gran afinidad de este fosfolípido hacia el anti-coagulante Anexina V, que en presencia de calcio se incrementa al orden de nanomolar, normalmente la translocación de la fosfatidilserina a la superficie celular precede a la fragmentación del ADN y a la aparición de otros marcadores de apoptosis, sin embargo en algunos tipos celulares, se ha demostrado que la exposición de la PS ocurre después de la activación de las caspasas. Aunque el mecanismo a través del cual se expone la PS no se ha definido aún, lo que es concluyente es que la PS está virtualmente ausente de la superficie de las células normales.^{11,12}

La Anexina V es una proteína humana endógena de 34 kDa, aislada inicialmente de la placenta humana y del cordón umbilical, la que al igual que la gran mayoría de las proteínas no penetra la membrana celular. Tiene una afinidad nanomolar hacia la PS y se "marca" con Tc99m lo que permite obtener la imagen gammagráfica después de su administración intravenosa (*Fig. 3*).^{1,65} Dicha imagen gammagráfica de la apoptosis se obtiene en el infarto agudo del miocardio y en la isquemia miocárdica

aguda,^{1,66} en el rechazo agudo del trasplante cardíaco,^{67,68} así como también en la del pulmón y del hígado,⁶⁹ en los tumores benignos y en los malignos intracardíacos,⁷⁰ en la miocarditis,⁷¹ en la cardiotoxicidad por doxorubicina y de otros derivados antracíclicos,⁷²⁻⁷⁴ en la artritis reumatoide,⁷⁵ en la miocardiopatía hipertrófica, dilatada, en las cardiopatías congénitas y en los trastornos de la conducción.^{5,7,36,61} También en la enfermedad focal del endotelio, en la túnica media y en la adventicia tanto de las pequeñas y grandes arterias coronarias y de forma concomitante en los miocitos, en las estructuras neurales y en los fibroblastos involucrados por la apoptosis.⁴⁷ Finalmente, ha sido utilizada para marcar los macrófagos del atero-ma de la placa vulnerable.⁷⁶ Recientemente se ha desarrollado el trazador con el PET 18-Flúor, marcando la Anexina V y con mejor calidad de imagen.^{1,77,78}

El diagnóstico clínico de la apoptosis es una realidad en la ciencia médica, cuya aplicación en diferentes facetas de la Cardiología, incluye desde la cardiopatía coronaria hasta los trastornos del ritmo. En este sentido, el uso de la imagenología no-invasiva, puede ser de gran utilidad para la detección *in vivo* de este tipo de muerte celular, en pacientes con necrosis miocárdica, con isquemia miocárdica aguda, con rechazo agudo del trasplante cardíaco, con miocarditis, con tumores malignos intracardíacos, así como en casos de cardiotoxicidad y de otras cardiomiopatías. Particularmente la unión de la Anexina V, marcada con Tc99m produce imágenes gammagráficas que permiten la identificación de células apoptóticas *in vivo*, en sistemas con el SPECT y SestaMiBi. En resumen, la utilización de estas técnicas será invaluable en un futuro próximo para la terapia e intervención anti-apoptosis en la rutina de la Cardiología diaria.

Conclusión

El mejor entendimiento de la biología de la apoptosis, así como su visualización controlada y secuencial, permitirán el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos, tanto al inicio, como en su progresión y también de las complicaciones tales como la insuficiencia cardíaca. Igualmente, será de gran importancia en el estudio y en la prevención de la cardiopatía congénita.

Estos hechos son una luz de gran optimismo en el futuro mediato de la Cardiología.

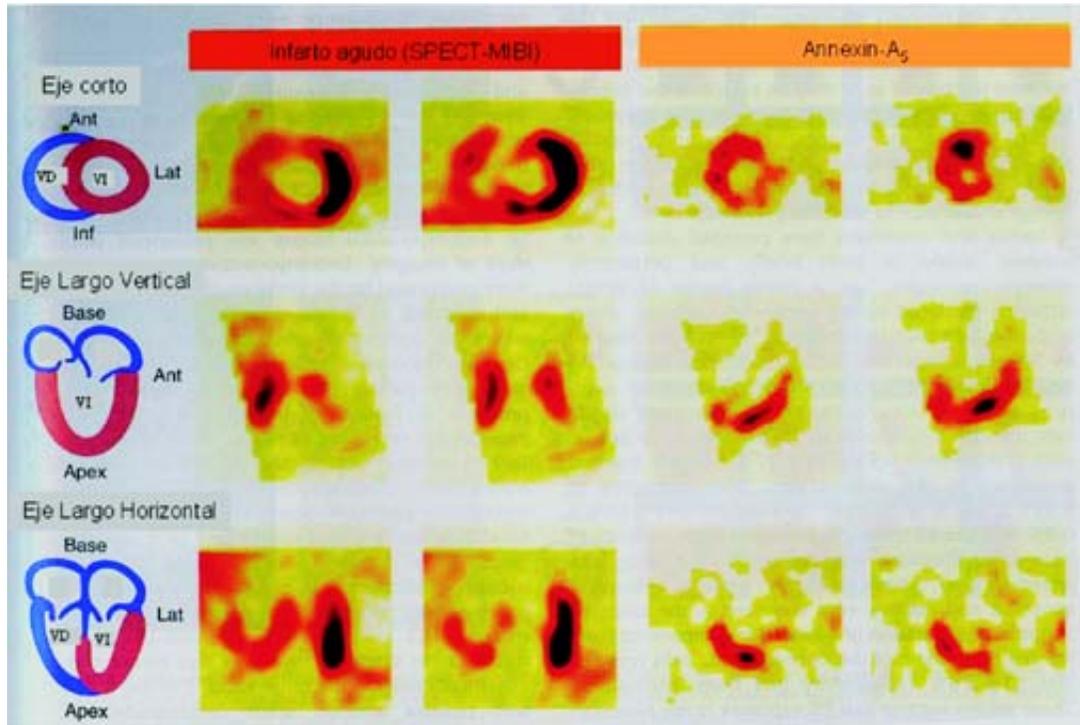


Fig. 3. Imágenes de perfusión miocárdica con infarto agudo antero-septal, apical e inferior y extensión al ventrículo derecho, obtenidas con SPECT y SestaMiBi. En el panel derecho se observa el área del miocardio en riesgo marcadas con Annexin-A5 indicando la presencia dentro del área de infarto de las células con muerte apoptótica.

Figura obtenida de: Hofstra L, Reutenligsperger C, Kietselaer B, Narula J, Strauss HW. Noninvasive Detection of Cell Death in Myocardial Disorders. In *Clinical Nuclear Cardiology*. Zaret BL, Beller GA. 3rd Ed Elsevier Mosby. 2005. pp. 650 y 653.

Referencias

- PANJRATH GS, JAIN D: *Myocardial Apoptosis for the Nuclear Physician*. Indian J Nucl Med 2004; 19: 68-74.
- THE YEH: *Life and death in the cardiovascular system*. Circulation 1997; 95: 782-786.
- ANDREOLI TE: *The apoptotic syndromes*. Am J Med 1999; 107: 488.
- NARULA J, KHAW BA, DEC GW JR, PALACIOS IF, SOUTHERN JF, FALLON JT, ET AL: *Recognition of acute myocarditis masquerading as acute myocardial infarction*. N Eng J Med 1993; 328: 100-4.
- SAIKUMAR P, DONG Z, MIKHAILOV V, DENTON M, WEIBERG JM, VENKATACHALAM MA: *Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease*. Am J Med 1999; 107: 489-506.
- GOTTLIEB RA, BURLESON KO, KLONER RA, BABIOR BM, ENGLER RL: *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes*. J Clin Invest 1994; 94: 1621-28.
- HETTS SW: *To die or not to die: overview of apoptosis and his role in disease*. JAMA 1998; 279: 300-7.
- MEIR P, FINCH A, EVAN G: *Apoptosis in development*. Nature 2000; 407: 796-801.
- KERR H, WYLLIE AH, CARRIE AR: *Apoptosis a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972; 26: 239-44.
- JAMES TN: *Apoptosis in cardiac disease*. Am J Med 1999; 107: 606-620.
- RODRIGUEZ-DIEZ G, OREA TA: *"Muerte Celular por Apoptosis"*. Capítulo 11. En: Ferez S, Lupi E. Comportamiento del Miocardio en la Isquemia y en la Reperusión. México D.F. Elsevier Ed 2004. pp 859-862.
- REED J: *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol 2000; 157: 1415-29.
- HOCKENBERRY D: *Defining apoptosis*. Am J Pathol 1995; 146: 16-19.
- HENGARTNER MO: *The biochemistry of apoptosis*. Nature 2000; 407: 770-776.
- SHIRAI T: *Commentary: oncosis and apoptosis: two faces of necrosis in a new proposal to clear up the confusion regarding cell death*. Toxicol Pathol 1999; 27: 495-96.

16. KNAAPEN MWM, DAVIES MJ, DEBIE M, HAVEN AJ, MARTINET W, KNOCKX MM: *Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure*. Cardiovasc Res 2001; 51: 304-12.
17. POOLE-WILSON PA: *Death or repair of the myocyte in chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol 2002; 40: 1103-5.
18. TH-ORNBERRY NA, LAZEBNIK Y: *Caspases: enemies within*. Science 1998; 281: 1312-16.
19. MANI K, KITSIS RN: *Myocyte Apoptosis: Programming Ventricular Remodeling*. J Am Coll Cardiol 2003; 41: 761-63.
20. GREEN DR: *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. Cell 2000; 102: 1-4.
21. GREEN DR: *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. Cell 1998; 94: 695-98.
22. AZKENAZI A, DIXIT VM: *Death receptors: signaling and modulation*. Science 1998; 281: 1305-08.
23. ZANZAMI N, KROEMER G: *The mitochondria in apoptosis: how Pandoras box opens*. Nat Rev Mol Cell 2001; 2: 67-71.
24. GROSS A, YIN XM, WANG K, WEI MC, JOCKEL J, MILLIMAN C, ET AL: *Caspase elevated BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents its release but not tumor necrosis factor -R1/Fas death*. J Biol Chem 1999; 274: 1156-63.
25. KISCHKE F, HELLBARDT S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER P, PETER M: *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins for a death inducing complex (DISC) with the receptor*. EMBO J 1995; 14: 5579-88.
26. BOLDIN M, GONCHAROV T, GOLTSEV Y, WALLACH D: *Involvement of MACH a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor induced cell death*. Cell 1996; 85: 803-15.
27. CROW M, MANI K, NAM Y, KITSIS R: *The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis*. Circ Res 2004; 95: 957-70.
28. KLUCK R, BOSSY-WETZEL E, GREEN D, NEWMAYER D: *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science 1997; 275: 1132-36.
29. DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X: *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell 2000; 102: 33-42.
30. FACCIO L, FUSCO C, CHEN A, MARTINOTTI S, BONVENTRE J, ZERVOS A: *Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia*. J Biol Chem 2000; 275: 2581-88.
31. SUSIN S, LORENZO H, ZAMZAMI N, MARZO I, SNOW B, BROTHERS G, ET AL: *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor*. Nature 1999; 397: 441-46.
32. LI L, LUO X, WANG X: *Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria*. Nature 2001; 412: 95-99.
33. HU Y, DING L, SPENCER D, NUÑEZ G: *WD-40 repeat regions regulates Apaf-1 self association and procaspase-9 activation*. J Biol Chem 1998; 273: 33489-94.
34. FISHER SA, LANGILLE BL, SRIVASTAVA D: *Apoptosis during cardiovascular development*. Circ Res 2000; 87: 856-64.
35. JAMES TN: *Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias*. Circulation 1994; 90: 556-73.
36. JAMES TN, ST MARTIN E, WILLIS PW, LOHR TO: *Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways*. Circulation 1996; 93: 1424-38.
37. KAJSTURA J, CHENG W, REISS K, CLARK WA, SONNENBLICK EH, KRAJEWSKI S, ET AL: *Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats*. Lab Invest 1996; 74: 86-107.
38. ABBATE A, BIONDI-ZOCCAI GGL, BUSANI R, DOBRINA A, CAMILOT D, FEROCCE F, ET AL: *Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure*. J Am Coll Cardiol 2003; 41: 753-60.
39. KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P: *Chimerism of the Transplanted Heart*. N Engl J Med 2002; 346: 5-15.
40. EGUCHI Y, SHIMUZU S, TSUJIMOTO T: *Intracellular ATP levels determine cell death rate by apoptosis or necrosis*. Cancer Res 1997; 57: 1835-40.
41. LEIST M, SINGLE B, CASTOLDI AF, KUHNLE S, NICOTERA P: *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med 1997; 185: 1481-86.
42. OKAMURA T, MIURA T, TAKEMURA G, FUJIWARA H, IWAMOTO H, KAWAMURA S, ET AL: *Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfusion rat heart*. Cardiovasc Res 2000; 45(3): 642-50.
43. HOLLY TA, DRINCIC A, BYUN Y, NAKAMURA S, HARRIA K, KLOCKE FJ, ET AL: *Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo*. J Mol Cell Cardiol 1999; 31(9): 1709-15.
44. WEILAND U, HAENDELER J, IHLING C, ALBUS U, SCHOLZ W, RUETTEN H, ET AL: *Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway*. Cardiovasc Res 2000; 45(3): 671-78.
45. HUMPHREYS RA, HAIST JV, CHAKRABARTI S, FENG Q, ARNOLD JM, KARMAZYN M: *Orally administe-*

- red NHE1 inhibitor cariporide reduces acute responses to coronary occlusion and reperfusion.* Am J Physiol 1999; 276(2 Pt 2): H749-57.
46. RUPPRECHT HJ, VOM DAHL J, TERRES W, SEYFARTH KM, RICHAFT G, SCHULTHEIBETA HP, ET AL: *Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA.* Circulation 2000; 101(25): 2902-08.
 47. FLOTATS A, CARRIÓ I: *Non-invasive in vivo imaging of myocardial apoptosis and necrosis.* Eur J Nucl Med 2003; 30: 615-30.
 48. POLLMAN MJ, HALL JL, MANN MJ, ZHANG L, GIBBONS MJ: *Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease.* Nature Med 1998; 4: 222-27.
 49. QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, ET AL: *Chimerism of the Transplanted Heart.* N Engl J Med 2002; 346: 5-15.
 50. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, ET AL: *Bone Marrow cells regenerate infarcted myocardium.* Nature 2001; 410: 7012-15.
 51. BIALOSTOZKY D: *El Corazón Humano se Regenera. En Presente y Futuro de la Imagenología en la Investigación Clínica y Experimental.* Barcelona, España. Ed. Permanger. Barcelona, España. En prensa.
 52. BRINK AJ, TORRINGTON M: *Progressive familial heart block- two types.* South African Med J 1977; 52: 53-59.
 53. BRUGADA J, BRUGADA R, BRUGADA P: *Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3. A marker of sudden death in patients without demonstrable structural heart disease.* Circulation 1998; 97: 457-60.
 54. JERVELL A, LANGE-NIELSEN F: *Congenital deafmutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval, and sudden death.* Am Heart J 1957; 54: 59-68.
 55. FRAZER GR, FROGGATT P, JAMES TN: *Congenital deafness associated with electrocardiographic abnormalities, fainting attacks and sudden death. A recessive syndrome.* Quar J Med 1964; 33: 361-85.
 56. UHL HSM: *Uhl's anomaly revisited.* Circulation 1996; 6: 1083-95.
 57. MALLAT Z, TEDGUI A, FONTALIRAN F, FRANK R, DURIGON M, FONTAIN G: *Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia.* N Engl J Med 1996; 335: 1190-96.
 58. VALENTE M, CALABRESE F, THIENE G, ANGELINI A, BASSO C, NAVA A, ET AL: *In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.* Am J Pathol 1998; 152: 479-84.
 59. ANKER SD, PONIKOWSKI PP, CLARK AL, LEYVA F, RAUCHHAUS M, KEMP M, ET AL: *Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure.* Eur Heart J 1999; 20: 683-93.
 60. BARTUNEK J, VANDERHEYDEN M, KNAAPEN MWM, TACK W, KOCKX MM, GOETHALS M: *Deoxyribonucleic acid damage/repair proteins are elevated in the failing human myocardium due to idiopathic dilated cardiomyopathy.* J Am Coll Cardiol 2002; 40: 1097-103.
 61. NARULA J, KHAW BA, DEC GW JR, PALACIOS IF, SOUTHERN JF, FALLON JT ET AL: *Recognition of acute myocarditis masquerading as acute myocardial infarction.* N Engl J Med 1993; 328: 100-04.
 62. NARULA J, ZARET BL: *Noninvasive detection of cell death: from tracking epitaphs to counting coffins.* J Nucl Cardiol 2002; 9: 554-60.
 63. KHAW B-A, DA SILVA J, PETROV A, HARTNER W: *Indium111 antymyocin and Tc-99m glucaric acid for non-invasive identification of oncotic and apoptotic necrosis.* J Nucl Cardiol 2002; 9: 471-81.
 64. BLANKENBERG FG, KATSIKIS PD, TAIT JF, DAVIS RE, NAUMOVSKI L, OHTSUKI K, ET AL: *In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death.* Proc Nat Acad Sci USA 1998; 95: 6349-54.
 65. KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CP, KUIJTEN GA, KEEHNEN RM, PALS ST, VAN OERS MX: *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression during programmed cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction.* Blood 1994; 84: 1415-20.
 66. THIMISTER PW, HOFSTRA L, LIEM IH, BOERSMA, KEMERINK G, REUTELINGSPERGER CP, ET AL: *In vivo detection of cell death in the area at risk in acute myocardial infarction.* J Nucl Med 2003; 44:391-96.
 67. NARULA J, ACIO ER, NARULA N, SAMUELS LE, FYFE B, WOOD D, ET AL: *Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection.* Nat Med 2001; 7(12): 1347-52.
 68. VRIENS PW, BLANKENBERG FG, STOOT JH, OHTSUKI K, BERRY GJ, TAIT JF, ET AL: *The use of technetium Tc 99m annexin V for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection.* J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 116(5): 844-53.
 69. BELHOCINE T, STEINMETZ N, GREEN A, RIGO P: *In vivo imaging of chemotherapy-induced apoptosis in human cancers.* Ann N Y Acad Sci 2003; 1010: 525-29.
 70. HOFSTRA L, DUMONT EA, THIMISTER PW, HEIDENDAL GA, DEBRUINE AP, ELENBAAS TW, ET AL: *In vivo detection of apoptosis in an intracardiac tumor.* JAMA 2001; 285: 1841-42.
 71. YASUDA T, PALACIOS IF, DEC GW, FALLON JT, GOLD HK, LEINBACH RC, ET AL: *Indium 111-monoclonal antiomyosin antibody imaging in the diagnosis of acute myocarditis.* Circulation 1987; 76: 306-11.
 72. MITANI I, JAIN D, JOSKA TM, BURTNES B, ZARET B: *Doxorubicin cardiotoxicity: Prevention of con-*

- gestive heart failure with serial cardiac function monitoring with equilibrium radionuclide angiography in the current era.* J Nucl Cardiol 2003; 10: 132-9.
73. JAIN D: *Cardiotoxicity of Doxorubicin and other anthracycline derivatives.* J Nucl Cardiol 2000; 7: 53-62.
74. KUGE Y, SATO M, ZHAO S, TAKEI T, NAKADA K, SEKI KI, ET AL: *Feasibility of ^{99m}Tc -annexin V for repetitive detection of apoptotic tumor response to chemotherapy: an experimental study using a rat tumor model.* J Nucl Med 2004; 45(2): 309-12.
75. POST AM, KATSIKIS PD, TAIT JF, GEAGHAN SM, STRAUSS HW, BLANKENBERG FG: *Imaging cell death with radiolabeled annexin V in an experimental model of rheumatoid arthritis.* J Nucl Med 2002; 43(10): 1359-65.
76. KOLODZIE FD, PETROV A, VIRMANI R, NARULA N, VERJANS JW, WEBER DK, ET AL: *Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque.* Circulation 2003; 108(25): 3134-9.
77. MURAKAMI Y, TAKAMATSU H, TAKI J, TATSUMI M, NODA A, ICHISE R, ET AL: *^{18}F -labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004; 31: 469-74.
78. ITESCU S, SCHUSTER MD, KOCHER AA: *New directions in strategies using cell therapy for heart disease.* J Mol Med 2003; 81: 288-96.