

Apoptosis y rechazo agudo celular en el trasplante cardiaco humano

Carmen Cristóbal^a, Javier Segovia^b, Luis A. Alonso-Pulpón^b, Evaristo Castedo^b, Juan A. Vargas^b y Juan C. Martínez^c

^aServicio de Cardiología. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid. España.

^bUnidad de Trasplante Cardiaco. Hospital Puerta de Hierro. Majadahonda. Madrid. España.

^cInstituto Oftálmico. Madrid. España.

Introducción y objetivos. La apoptosis se ha implicado en la fisiopatología de diversas cardiopatías. El rechazo agudo celular causa morbilidad tras el trasplante cardiaco y su diagnóstico requiere técnicas invasivas. Hemos investigado la existencia de apoptosis de cardiomiocitos en el corazón trasplantado, su evolución temporal, su relación con el rechazo y la posibilidad de diagnosticar de forma no invasiva el rechazo mediante detección de marcadores séricos de apoptosis.

Métodos. Análisis histoquímico de 130 biopsias endomiocárdicas obtenidas secuencialmente de 14 pacientes consecutivos en los primeros 6 meses tras el trasplante. Se determinaron: grado de rechazo agudo, apoptosis de cardiomiocitos mediante TUNEL y actividad de caspasa 3. En los primeros 10 pacientes, se analizaron en sueros extraídos simultáneamente a las biopsias: Fas soluble, factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6.

Resultados. Se detectaron células apoptóticas en el 81,5% de las biopsias. No encontramos correlación del índice apoptótico con el grado de rechazo ni con el tiempo desde el trasplante, sólo una tendencia a valores mayores en casos de rechazo prolongado que no alcanza la significación estadística. Observamos correlación inversa entre grado de rechazo y factor de necrosis tumoral alfa ($r_s = -0,33$; $p = 0,003$). No encontramos correlación del rechazo con el resto de las variables.

Conclusiones. Detectamos en el corazón trasplantado pérdida de cardiomiocitos por apoptosis. No hallamos correlación con el rechazo agudo ni con el tiempo desde el trasplante. Nuestros datos indican que podría haber correlación inversa entre rechazo y factor de necrosis tumoral alfa en suero. Consideramos que ninguno de los parámetros séricos valorados es óptimo para diagnóstico no invasivo de rechazo.

Palabras clave: Apoptosis. Rechazo agudo celular. Trasplante cardiaco.

Apoptosis and Acute Cellular Rejection in Human Heart Transplants

Introduction and objectives. Apoptosis has been implicated in the pathophysiology of various forms of heart disease. Acute cellular rejection leads to morbidity after heart transplantation and invasive techniques are needed for its diagnosis. We investigated the presence of cardiomyocyte apoptosis in transplanted hearts, its progression, its relationship with rejection, and the possibility that serological markers of apoptosis can be used to detect rejection noninvasively.

Methods. Overall, 130 endomyocardial biopsies obtained sequentially from 14 consecutive patients during the first 6 months following heart transplantation underwent histochemical analysis. The degree of acute rejection was determined, myocyte apoptosis was assessed using the TUNEL method, and caspase-3 activity was measured. In the first 10 patients, soluble Fas, tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and interleukin 6 levels were determined in serum collected at biopsy.

Results. Apoptotic cells were detected in 81.5% of biopsies. No significant correlation was found between the apoptotic index and either the degree of rejection or the time from transplantation; there was only a trend to higher values during prolonged episodes of rejection, which did not reach statistical significance. An inverse correlation was observed between the degree of rejection and the TNF α level ($r_s = -0.33$; $P = .003$). There was no correlation with any other variable.

Conclusions. Cardiomyocyte loss due to apoptosis was observed in transplanted hearts, but no correlation was observed with either acute rejection or the time from transplantation. Our findings suggest there could be an inverse correlation between rejection and the serum TNF α level. No serum parameter evaluated was regarded as suitable for the noninvasive diagnosis of acute rejection.

Key words: Apoptosis. Acute cellular rejection. Heart transplantation.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

Fuente de financiación: Fundación Mapfre Medicina.

Correspondencia: Dra. C. Cristóbal.
Servicio de Cardiología. Hospital Universitario de Fuenlabrada.
Camino del Molino, 2. 28942 Fuenlabrada. Madrid. España.
Correo electrónico: ccristobal.hflr@salud.madrid.org

Recibido el 22 de junio de 2009.

Aceptado para su publicación el 3 de marzo de 2010.

ABREVIATURAS

ISHLT: International Society for Heart and Lung Transplantation.

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

TUNEL: *TdT-mediated dUTP nick end labelling*.

INTRODUCCIÓN

El rechazo agudo celular causa morbilidad y pérdida celular en el injerto tras el trasplante cardiaco y requiere una monitorización invasiva mediante realización de biopsias endomiocárdicas seriadas¹.

La apoptosis o «muerte celular programada» está implicada en diversas cardiopatías, y se han observado resultados dispares en cuanto a la existencia de una posible relación entre apoptosis y rechazo agudo celular²⁻¹⁰. En estudios experimentales en ratas, se detectó apoptosis de miocitos en aloinjertos, pero no en homoinjertos^{2,3}; aunque Bergese et al⁴ concluyeron que la apoptosis no era indicativa de rechazo agudo, sino que se relacionaba con el rechazo crónico. En cuanto al trasplante cardiaco humano, Laguens et al⁵ estudiaron 63 biopsias endomiocárdicas de 6 receptores, y encontraron apoptosis de miocitos más frecuentemente en muestras con mayor rechazo. Jollow et al⁶ estudiaron 22 biopsias con rechazo moderado, y no encontraron apoptosis de miocitos, sino solamente de células mononucleares. Szabolcs et al⁷ analizaron 30 biopsias con rechazo 2R/3R frente a 12 sin rechazo, y encontraron 30 veces más cardiomiocitos apoptóticos en el primer grupo. Puig et al⁸, mediante estudio histológico y marcación isotópica de 40 biopsias, observaron apoptosis de cardiomiocitos más frecuente en el rechazo grave, pero también en muestras sin rechazo histológico. Masri et al⁹, tras evaluar 59 biopsias de 24 pacientes, detectaron actividad de caspasa aumentada y apoptosis predominantemente de células infiltrativas durante el rechazo agudo, persistente tras su resolución histológica. Koch et al¹⁰ valoraron biopsias de 27 receptores y detectaron apoptosis casi exclusiva de células intersticiales, en mayor cantidad y con mayor expresión de la molécula antiapoptótica Bcl-2 para mayores grados de rechazo; en cardiomiocitos apenas detectaron apoptosis, y no hubo diferencias en la expresión de Bcl-2. En cuanto a los mecanismos implicados en la apoptosis en el trasplante cardiaco, se ha estudiado el papel del óxido nítrico a través de la sintasa del NO (NOS)^{7,11}, del sistema Fas/FasL^{3,12,13} y de la familia de mediadores Bax/Bcl-2^{10,14}, entre otros.

Constatar la posible implicación de la apoptosis en la fisiopatología del rechazo agudo celular e in-

vestigar las vías moleculares implicadas podrían abrir una puerta a nuevos abordajes diagnósticos y terapéuticos del rechazo. Hemos aplicado diversas técnicas de detección de apoptosis al tejido miocárdico y el suero de pacientes trasplantados cardiacos, con la finalidad de: *a)* valorar la existencia de apoptosis de cardiomiocitos en el corazón trasplantado humano como mecanismo de pérdida celular y su evolución temporal; *b)* estudiar la posible asociación entre apoptosis de cardiomiocitos y rechazo agudo celular, y *c)* analizar la posibilidad de detección no invasiva del rechazo mediante determinación de marcadores serológicos de apoptosis.

La apoptosis celular tiene mecanismos reguladores que implican gran número de mediadores celulares. Puede iniciarse a través de dos vías: extrínseca e intrínseca. Ambas confluyen en la activación de las caspasas, conjunto de proteasas intracelulares que actúan escalonadamente y finalmente producen los cambios morfológicos en la célula¹⁵⁻¹⁷. Hemos seleccionado para su valoración en el trasplante cardiaco humano variables que actúan en cada uno de los tres niveles de la secuencia temporal del proceso de muerte celular programada: Fas soluble, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucina (IL) 6 como parámetros séricos relacionados con la puesta en marcha de la apoptosis a través de la vía extrínseca, detección de caspasa 3 como enzima que pudiera desempeñar un papel central en el proceso y *TdT-mediated dUTP nick end labelling* (TUNEL) como detector de apoptosis de miocitos ya establecida.

MÉTODOS

Diseño del estudio

Cohorte clínica prospectiva en la que se incluyó consecutivamente a todos los pacientes sometidos a trasplante cardiaco en nuestra unidad durante 6 meses (n = 14 pacientes). Se establecieron como criterios de exclusión: fallecimiento durante el postoperatorio inicial y retrasplante.

Se extrajeron biopsias endomiocárdicas en los primeros 6 meses tras el trasplante, periodo de máxima incidencia de rechazo agudo (n = 130 biopsias; 7-12/paciente). En los primeros 10 pacientes, se realizaron extracciones de suero simultáneas a la toma de biopsias (n = 80 muestras); no se realizó en los 4 pacientes restantes por limitaciones en la disponibilidad de reactivos.

Se realizó un seguimiento clínico prospectivo hasta 4 años desde el inicio de la inclusión según protocolo clínico habitual de la unidad, y se recogieron datos del receptor, el donante, la intervención, la pauta de inmunosupresión y la evolución clínica.

Variables en estudio

En las biopsias se determinó el grado de rechazo agudo celular (International Society for Heart and Lung Transplantation [ISHLT]), se valoró la apoptosis de cardiomiocitos mediante la técnica TUNEL y se realizó detección de caspasa 3. En las muestras de suero se cuantificaron Fas soluble, TNF α e IL-6.

Obtención y procesamiento de las muestras

Se siguió el protocolo de monitorización del rechazo vigente en el momento del estudio (primera biopsia a los 10-12 días del trasplante, cada 10 días durante los primeros 2 meses, cada 15 días durante los meses 3 y 4, y cada mes los meses 5 y 6).

Se realizó la extracción de biopsias según protocolo habitual, y se obtuvieron 4-6 muestras de endomiocardio del ventrículo derecho de 2-3 mm de diámetro por paciente y procedimiento. Se fijaron en una solución de formaldehído tamponado al 10% (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y se mantuvieron 30 min en formol caliente (70 °C). Tras inclusión en parafina, se procedió al corte del tejido con microtomo (3-4 μ m) Jung RM 2035 (Leika, España), que se colocó en un portaobjetos. Las muestras se consideraron suficientes cuando había al menos tres fragmentos evaluables, descartadas áreas de fibrosis por biopsia previa.

Se extrajeron 80 muestras de sangre de los primeros 10 pacientes incluidos en el mismo día de la toma de biopsias. Se procesaron para obtener suero.

Determinación del grado de rechazo

Se tiñeron las muestras con hematoxilina-eosina y tricómico de Masson. Se determinó el grado de rechazo según la clasificación ISHLT vigente cuando se diseñó el estudio: 0, ausencia de rechazo; 1A, infiltrado focal sin necrosis; 1B, infiltrado difuso sin necrosis; 2, un foco de infiltrado agresivo y/o daño miocítico focal; 3A, infiltrados agresivos multifocales y/o daño de miocitos; 3B, infiltrados inflamatorios difusos con necrosis; 4, infiltrado inflamatorio polimorfo difuso, con edema, hemorragia, vasculitis y necrosis. Clasificación actual ISHLT: 0R = 0; 1R = A, 1B y 2; 2R = 3A; 3R = 3B y 4.

Detección de apoptosis de miocitos mediante TUNEL

La técnica TUNEL se basa en marcar y detectar el extremo 3'OH expuesto de forma característica al fragmentarse el ADN en el proceso apoptótico. De-

tecta núcleos de células apoptóticas en cortes histológicos sin destruir la integridad tisular.

Se realizó la unión de dichos fragmentos de ADN a desoxiuridinotri-fosfato (dUTP) marcado con fluoresceína, en una reacción mediada por desoxinucleotidiltransferasa (TdT) (Boehringer Mannheim, In Situ Cell Death Detection Kit, POD). Las secciones de tejido fueron desparafinadas con xileno y rehidratadas con alcohol, se introdujeron en una solución de citrato 0,1 mol y se calentaron en microondas durante 5 min. Se lavaron y se cubrieron con la mezcla TUNEL, que contenía TdT y fluoresceína-dUTP, y se incubaron en cámara húmeda durante 1 h a 37 °C y a continuación con un anticuerpo específico para fluoresceína conjugado con peroxidasa. La utilización de diaminobenzidina permitió ver los núcleos marcados en color marrón. Se tiñeron con hematoxilina los núcleos sin fragmentación del ADN. En todos los casos se procesó con las biopsias una muestra de amígdala palatina humana como control (sabemos que en los folículos linfoides de la amígdala se produce habitualmente apoptosis).

Cada sección de tejido fue examinada con microscopio óptico a 25, 100 y 400 aumentos. En cada muestra se examinaron diez campos al azar a 400 aumentos, se cuantificó el número de cardiomiocitos positivos para TUNEL y se definió como índice apoptótico su valor medio.

Detección histoquímica de actividad de caspasa 3

Se cree que la caspasa 3 (CPP32) podría desempeñar un papel central en la apoptosis. Analizamos el grado de expresión de CPP32 en el endomiocardio mediante técnicas histoquímicas. Para ello, tras desparafinación y rehidratación, se incubaron las secciones de tejido con un suero de caballo durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con salino tamponado y se tiñeron con un anticuerpo específico monoclonal de ratón, que se empleó a una dilución de 1:1.000. Como controles negativos, en varias muestras se realizó la técnica sin el anticuerpo. Cada sección de tejido se examinó con microscopio óptico a 25, 100 y 400 aumentos y se valoró según la positividad o negatividad en cardiomiocitos de la técnica descrita.

Determinación de Fas soluble en suero

Fas y Fas ligando (FasL) son proteínas de la superficie celular y ambas tienen una forma soluble. Fas induce apoptosis cuando se une a FasL o a la forma soluble de FasL. Fas soluble, que carece de la porción transmembrana de Fas, bloquea la apoptosis, porque inhibe la unión de Fas a FasL o a

FasL soluble. Su determinación se realizó en suero mediante ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) (sAPO-1/Fas ELISA Zymed Laboratories Inc.).

Determinación de TNF α en suero

El TNF α induce apoptosis a través de la unión a su receptor específico en la membrana celular, TNF-R1, poniendo en marcha la vía extrínseca. Su determinación se realizó en suero mediante ELISA (QuantikineHS human TNF α).

Determinación de IL-6 en suero

La IL-6 es un inductor de apoptosis relacionado con el sistema Fas-FasL, que induce la transcripción del gen del receptor Fas/APO 1. Su determinación se realizó en suero mediante ELISA (Quantikine HS human IL-6).

La concentración de cada producto soluble se calculó extrapolando la densidad óptica de cada muestra problema de una curva patrón realizada con las densidades ópticas de diferentes muestras con concentraciones conocidas de cada producto. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Se recogieron los resultados de las variables con media, mediana, desviación típica, mínimo y máximo en cada paciente. La comparación de los intervalos promedio de los pacientes en cuanto a los parámetros analizados se realizó mediante un análisis de varianza no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis), con la finalidad de identificar diferencias en la variabilidad entre pacientes; si esta variabilidad era significativa, no se analizaba la variable en los siguientes análisis. La hipótesis de normalidad de las distribuciones de datos se realizó con el test de Shapiro-Wilk. Dado que las variables de las muestras no seguían una distribución normal, se utilizó para valorar su grado de correlación el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman y su contraste de hipótesis. La valoración de la capacidad diagnóstica para detectar rechazo de las variables serológicas estudiadas se realizó mediante la obtención de las curvas ROC, y se resume en su área bajo la curva (intervalo de confianza [IC] del 95%) y su contraste de hipótesis. Se hizo una valoración de la evolución de los diversos parámetros en el tiempo. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. El tratamiento estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS v. 10.0 para sistema operativo Windows.

RESULTADOS

Se incluyó a 14 pacientes (12 varones; media de edad, $50 \pm 8,4$ años). Las cardiopatías que motivaron el trasplante fueron: miocardiopatía isquémica ($n = 7$ pacientes), dilatada idiopática ($n = 6$), insuficiencia aórtica ($n = 1$) y enólica ($n = 1$). Los donantes fueron varones entre 21 y 52 años. El trasplante se realizó según técnica estándar en 11 pacientes y bicava en 3. Se realizó en todos los pacientes terapia inmunosupresora de inducción con OKT3 y de mantenimiento con ciclosporina, azatioprina y esteroides, excepto en 1 caso, en que se utilizó micofenolato en lugar de azatioprina. Un paciente falleció súbitamente en su séptimo mes postrasplante durante un cuadro infeccioso; los demás estaban en buena situación funcional al final del seguimiento. Once pacientes sufrieron algún episodio de rechazo 2R o mayor y recibieron tratamiento específico.

La distribución de las 130 biopsias en cuanto a grado de rechazo fue la siguiente: 0R, 62; 1R, 39 (1A, 12; 1B, 12; 2, 15); 2R, 27; 3R, 2 biopsias.

Se detectaron cardiomiocitos apoptóticos mediante TUNEL en 106 de las 130 biopsias, lo que confirma la existencia de apoptosis en el corazón trasplantado. El valor medio del índice apoptótico fue $1,2 \pm 1,48$. No se encontró correlación significativa entre valores TUNEL y grado de rechazo ($r_s = 0,08$; $p = 0,37$) (fig. 1). Se detectaron miocitos TUNEL positivos en biopsias sin rechazo.

De las muestras valoradas, 30 fueron positivas para detección histoquímica de caspasa 3 y 68, negativas (tabla 1). Las demás se consideraron no valorables o muestra disponible insuficiente. No se encontró correlación de positividad para caspasa 3 con grado de rechazo ni con valores TUNEL.

No se observó correlación significativa entre grado de rechazo y valores de Fas soluble ($r_s = 0,44$; $p = 0,7$) (fig. 2).

La comparación entre pacientes en cuanto a valores de IL-6 mediante análisis de varianza (Kruskal-Wallis) mostró diferencias significativas entre ellos ($p < 0,005$), por lo que no se consideró adecuado continuar su valoración en relación con otras variables del estudio.

TABLA 1. Positividad de caspasa 3 en relación con rechazo celular agudo

Grado rechazo	Caspasa 3 (%)	
	Negativo	Positivo
< 2R (< 3A)	72,5	27,5
$\geq$ 2R ($\geq$ 3A)	65,2	34,8
Total	70,7	29,3

Fig. 1. Valores de apoptosis detectada mediante TUNEL para cada grado de rechazo ($n = 130$ biopsias). Grados de rechazo según ISHLT (clasificación antigua entre paréntesis). La gradación de apoptosis se realiza según el «índice apoptótico» obtenido según se explica en el texto. En el gráfico, los límites de la caja son los percentiles 25 y 75; en negro se representa la mediana, y los valores extremos se representan fuera de los límites siempre que sobrepasen 1,5 veces la distancia desde el cuartil correspondiente hasta el límite del cierre (los valores representados por asteriscos son los valores más extremos, que sobrepasan 3 veces la distancia señalada).

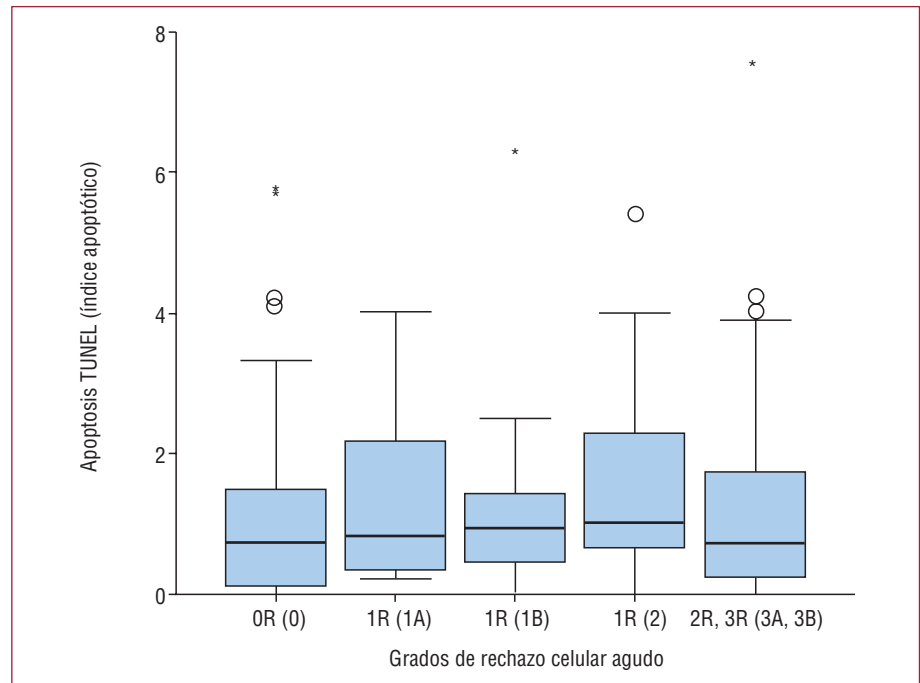
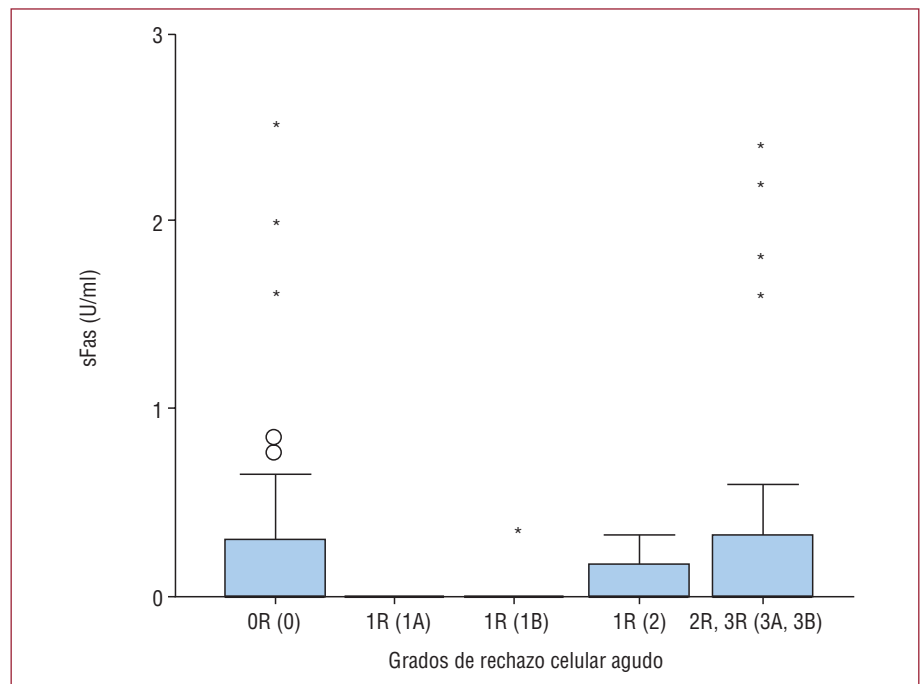


Fig. 2. Valores de Fas soluble (U/ml) para cada grado de rechazo ($n = 80$ muestras de suero). Representación gráfica similar a fig. 1.



Se encontró correlación negativa significativa entre grado de rechazo y valores de $\text{TNF}\alpha$ ($r_s = -0,333$; $p = 0,003$) (fig. 3). A partir de este hallazgo, se realizó una valoración de su aptitud como test diagnóstico del rechazo mediante obtención de la curva ROC. El valor del área bajo la curva resultó bastante bajo (0,68) y no se consideró indicado determinar puntos de corte (fig. 4). Interpretamos que la exactitud de la prueba es demasiado baja para resultar útil en el diagnóstico no invasivo del rechazo.

La evolución de las variables TUNEL, Fas soluble e IL-6 no siguió ningún patrón temporal (fig. 5A-C). Prescindiendo de los valores coincidentes con episodios de rechazo, la evolución del $\text{TNF}\alpha$ fue ligeramente ascendente desde el momento del trasplante (fig. 5E).

Se realizó una valoración de las variables en casos de rechazo prolongado frente a los de ausencia prolongada de rechazo, definidos respectivamente como grado $\geq 3A$ ($\geq 2R$) y como grado 0R durante al menos dos biopsias consecutivas. Los valores de

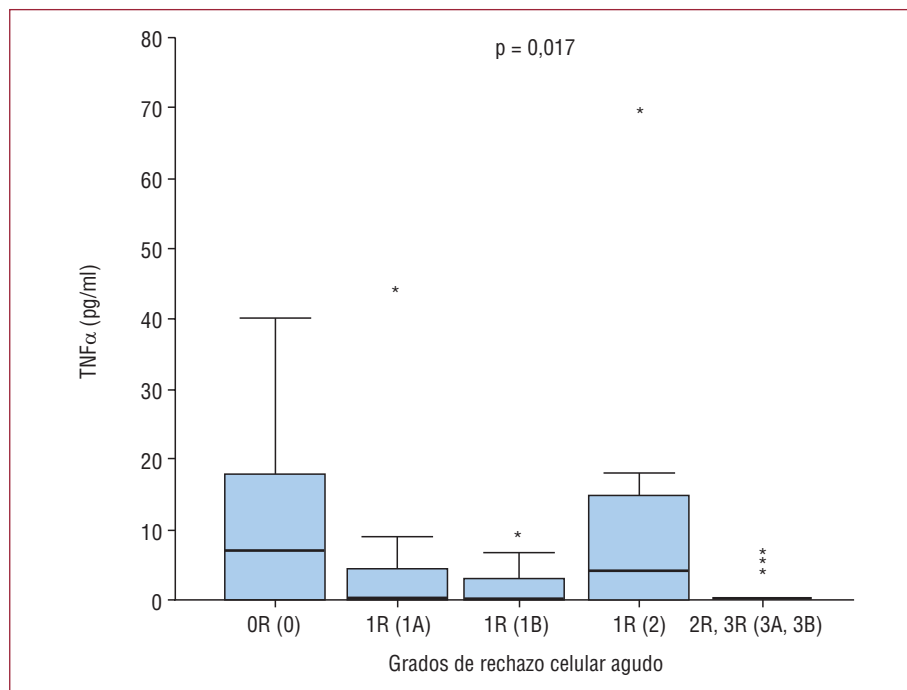


Fig. 3. Valores de factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) en suero (pg/ml) para cada grado de rechazo (n = 80 muestras de suero). Representación gráfica similar a fig. 1.

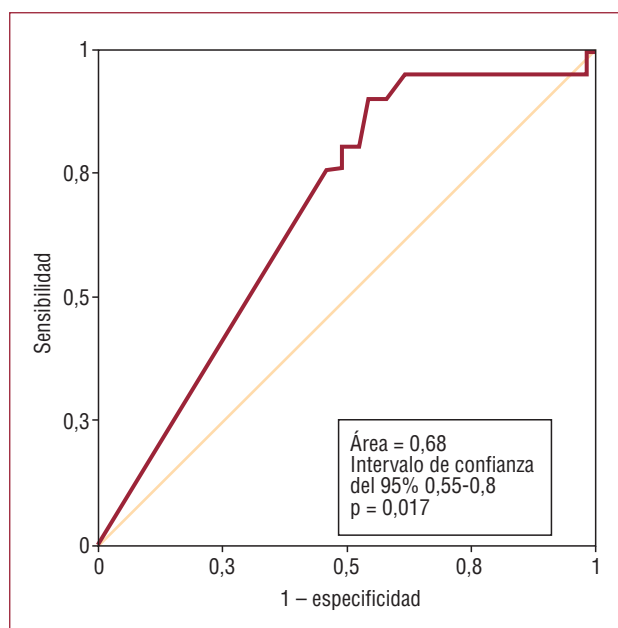


Fig. 4. Valoración de la aptitud del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) para diagnóstico no invasivo del rechazo agudo. Curva ROC.

TNFα eran significativamente menores en los casos de rechazo prolongado ($p = 0,008$). Hubo tendencia a encontrar valores de apoptosis de cardiomiocitos más altos en los episodios de rechazo prolongado, pero no llegó a alcanzar significación estadística ($p = 0,168$). En el resto de las variables no se encontraron diferencias significativas.

DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primer estudio longitudinal sobre apoptosis en el rechazo agudo celular en el trasplante cardiaco humano, con datos seriados de pacientes en los mismos tiempos desde el trasplante y con seguimiento evolutivo. Además, hemos seleccionado las variables tratando de estudiar la apoptosis en distintos puntos de su secuencia temporal. En cuanto al número de biopsias analizadas, es el estudio más amplio publicado en este campo. Como resultado, hemos detectado muerte de cardiomiocitos por apoptosis en el corazón trasplantado, aunque no hemos podido establecer una relación entre apoptosis y rechazo. Habiendo aplicado el método histoquímico más ampliamente utilizado, la técnica TUNEL de detección de los oligofragmentos del ADN que típicamente se producen en la apoptosis, no hemos detectado correlación significativa con el rechazo ($p = 0,37$). Únicamente en rechazos prolongados observamos una tendencia a valores más altos de TUNEL, pero sin alcanzar significación estadística ($p = 0,16$).

Gran parte de los estudios sobre apoptosis en el trasplante cardiaco se han realizado en modelos experimentales en animales²⁻⁴, con resultados difícilmente extrapolables al complejo proceso del trasplante cardiaco humano. De los llevados a cabo en el hombre⁵⁻¹⁰ se intuye que podría haber cierta correlación entre apoptosis y rechazo, aunque no se corrobora en todos los estudios, que se han realizado con un número de muestras inferior al que presentamos. El hecho de detectar apoptosis en

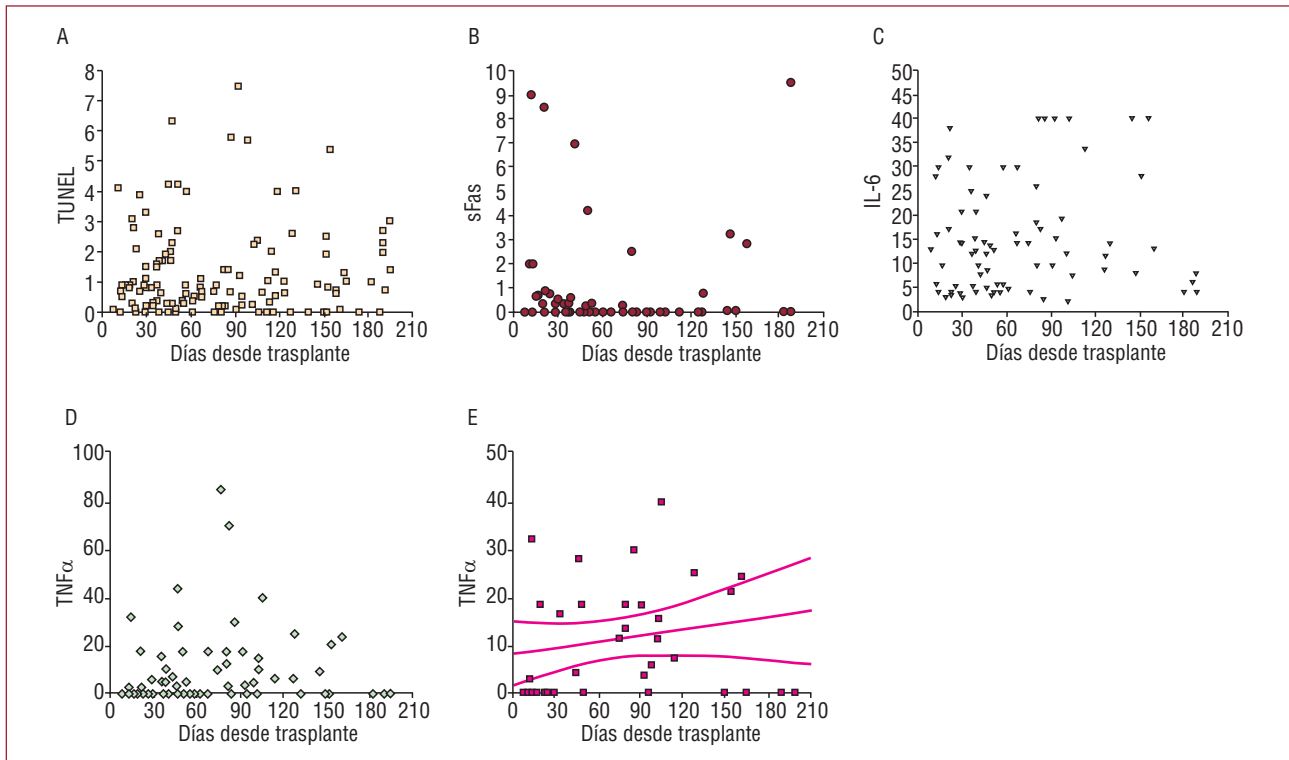


Fig. 5. Evolución de las variables. A-C: TUNEL, Fas soluble e interleucina 6 (IL-6) no siguen ningún patrón en el tiempo. D y E: el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) sigue una evolución ligeramente ascendente desde el momento del trasplante si prescindimos de los valores que coinciden con episodios de rechazo.

muestras sin rechazo indica que hay otros mecanismos en el injerto cardiaco que la causan.

Delimitar la hipotética interrelación entre apoptosis y rechazo en el seno de un proceso tan complicado como el trasplante cardiaco resulta difícil, ya que, además del rechazo, confluyen múltiples estímulos que pueden causar apoptosis: tratamiento del donante con catecolaminas, isquemia del órgano desde la extracción al implante, circulación extracorpórea y administración de fármacos como los inhibidores de la calcineurina; así, la ciclosporina A actúa inhibiendo FasL y $\text{TNF}\alpha$, aumentando la IL-6 y modulando sustancias antiapoptóticas como la proteína Bcl-2¹⁴.

Otro punto de interés es la duda de en qué medida somos capaces realmente de detectar apoptosis con las técnicas de que disponemos. En la mayoría de los estudios se ha valorado mediante TUNEL, que detecta los fragmentos de ADN que se producen típicamente en este proceso y permite la cuantificación celular mediante microscopio óptico. Se ha postulado que la síntesis activa de ARN y el daño del ADN en células necróticas en algunos casos pueden causar tinción «no específica», y en algún estudio no se ha podido constatar datos morfológicos de apoptosis en células positivas para TUNEL por microscopía electrónica¹⁸. Llama la atención la disparidad entre los porcentajes de cé-

lulas apoptóticas detectadas mediante TUNEL en diferentes estudios en insuficiencia cardiaca^{19,20}.

Otra dificultad para la detección y la cuantificación de la muerte celular programada podría ser su escasa duración, ya que no queda huella una vez completada la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos; puesto que la estructura tisular queda intacta, se podría subestimar su magnitud total. Además, tanto rechazo como apoptosis son procesos de distribución irregular en el miocardio y, por lo tanto, están sujetos a una gran variabilidad del muestreo en la obtención de las biopsias.

En nuestro estudio no hemos encontrado correlación entre positividad para caspasa 3 y grado de rechazo. No está claro que esta enzima tenga un papel central en la apoptosis en todos los tipos celulares; algunos autores defienden que las caspasas varían dependiendo del tipo celular e incluso del estímulo que induzca el proceso¹⁶. En el trasplante cardiaco ha sido poco estudiada; en un estudio la inhibición de caspasa 3 parecía disminuir el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto²¹; en el rechazo agudo, Masri et al⁹ encontraron una actividad de caspasa 3 y 8 aumentada en el rechazo moderado, que persistía tras su resolución.

En cuanto al papel del sistema Fas/FasL, Toyozaki et al²² encontraron concentraciones de Fas soluble más altas en la miocarditis que en la insufi-

ciencia cardiaca o en voluntarios sanos. Varios estudios, sin embargo, han observado un aumento de Fas soluble en la insuficiencia cardiaca²³. En el trasplante cardiaco, un estudio reciente encontró una expresión aumentada de ARNm de Fas y FasL en biopsias con rechazo agudo, pero no encontraron diferencias en la expresión de Fas soluble con o sin rechazo¹³. Nosotros no hemos encontrado correlación significativa entre cifras de Fas soluble y grado de rechazo.

Está bien establecido que hay concentraciones altas de TNF α en pacientes con insuficiencia cardiaca y que puede ser deletéreo para la función miocárdica. En el trasplante cardiaco, desde etapas tempranas se observa una expresión aumentada, superior a los valores encontrados en insuficiencia cardiaca, que no se asocia a disfunción contráctil²⁴. Chollet et al²⁵ publicaron que el TNF α aumenta coincidiendo con el rechazo en el trasplante cardiaco, pero el escaso número de muestras del estudio limita su validez. Nuestros resultados, por el contrario, parecen indicar que el TNF α en suero podría disminuir en mayores grados de rechazo, si bien hay que tener en cuenta que se trata de un marcador bastante inespecífico. Dado que algunos inmunosupresores modulan sustancias que intervienen en la apoptosis, una explicación a este hallazgo podría estar en que los pacientes tuvieran grados de inmunosupresión más elevados.

Una limitación de nuestro estudio es que el tamaño muestral es exploratorio y relativamente pequeño en cuanto a número de pacientes, si bien, como hemos señalado, el número de biopsias estudiadas constituye una serie bastante amplia. Otra limitación es carecer de una prueba morfológica de confirmación, a tenor de los estudios que han ido apareciendo acerca de la inexactitud del TUNEL en la detección de apoptosis y de la posibilidad de que se produzca una fragmentación de ADN similar en otros procesos de muerte celular. Por último, si bien la biopsia endomiocárdica sigue siendo el mejor método para diagnosticar el rechazo, debemos tener en cuenta sus limitaciones para detectarlo.

CONCLUSIONES

Hemos detectado en el corazón trasplantado pérdida de cardiomiocitos por apoptosis. No hemos encontrado correlación entre la apoptosis detectada y el grado de rechazo agudo celular ni una pauta temporal desde el trasplante. Nuestros datos indican que podría haber correlación inversa entre el grado de rechazo y los valores de TNF α en suero. Consideramos que ninguno de los tres parámetros séricos relacionados con la apoptosis que hemos estudiado (Fas soluble, IL-6, TNF α) es apto para el diagnóstico no invasivo del rechazo celular agudo.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Puer-ta de Hierro, a Isabel Millán (Sección de Bioestadística) y a Cristina Fernández.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crespo-Leiro MG, Almenar L, Alonso-Pulpón L, Campreciós M, Cuenca JJ, De la Fuente L, et al. Conferencia de consenso de los grupos españoles de trasplante cardiaco. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2007;7:B4-54.
2. Szabolcs M, Michler RE, Yang X, Aji W, Roy D, Athan E, et al. Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase. *Circulation.* 1996;94:1665-73.
3. Kageyama Y, Li XK, Suzuki S, Suzuki H, Suzuki K, Kazui T, et al. Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats. *Ann Thorac Surg.* 1998;65:1604-9.
4. Bergese SD, Klenotic SM, Wakely ME, Sedmak DD, Orosz CG. Apoptosis in murine cardiac grafts. *Transplantation.* 1997;63:320-5.
5. Laguens RP, Cabeza PM, San Martino J, Perrone S, Favaloro R. Identification of programmed cell death in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:911-8.
6. Jollow KC, Sundstrom JB, Gravanis MB, Kanter K, Herskowitz A, Ansari AA. Apoptosis of mononuclear cell infiltrates in cardiac allograft biopsy specimens questions studies of biopsy cultured cells. *Transplantation.* 1997;63:1482-9.
7. Szabolcs MJ, Ravalli S, Minanov O, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation.* 1998;65:804-12.
8. Puig M, Ballester M, Matias-Guiu W, Bordes R, Carrió I, Kolodgie FD, et al. Burden of myocardial damage in cardiac allograft rejection: scintigraphic evidence of myocardial injury and histologic evidence of myocyte necrosis and apoptosis. *J Nucl Cardiol.* 2000;7:132-9.
9. Masri SC, Yamani MH, Russell MA, Ratliff NB, Yang J, Almasan A, et al. Sustained apoptosis in human cardiac allografts despite histologic resolution of rejection. *Transplantation.* 2003;76:859-64.
10. Koch A, Roth W, Steffek TM, Dengler TJ, Haass M, Karck M, et al. Impact of apoptosis in acute rejection episodes after heart transplantation: immunohistochemical examination of right ventricular myocardial biopsies. *Transplant Proc.* 2008;40:943-6.
11. Koglin J, Granville DJ, Glysing-Jensen T, Mudgett JS, McCarthy C, McManus BM, et al. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 $^{-/-}$ recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation.* 1999;99:836-42.
12. Josien R, Müschen M, Gilbert E, Douillard P, Heslan JM, Soullillou J, et al. Fas ligand, Tumor necrosis factor-(alpha) expression, and apoptosis allograft rejection and tolerance. *Transplantation.* 1998;66:887-93.
13. Pérez EC, Shulzenko N, Morgun A, Diniz RV, Almeida DR, Musatti CC, et al. Expression of Fas, FasL, and soluble Fas mRNA in endomyocardial biopsies of human cardiac allografts. *Hum Immunol.* 2006;67:22-6.
14. Nozyski M, Zakliczynski E, Zembala-Nozyska D, Konecka-Mrowja B, Nikiel R, Przybylski D, et al. Transplanted heart cardiomyocytes reveal continuous expression of antiapoptotic Bcl-2 protein. *Transplant Proc.* 2007;39: 2841-5.
15. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest.* 1998;78:893-913.
16. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature.* 1998;396:119-22.

17. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116:205-19.
18. Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, et al. Apoptotic myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation. *Circulation*. 1998;98:1422-30.
19. Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 1996;335:1182-9.
20. Olivetti G, Abbi R, Quani F. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997;336:1131-41.
21. Balsam LB, Mokhtari GK, Jones S, Peterson S, Hoyt EG, Kofidis T, et al. Early inhibition of caspase-3 activity lessens the development of graft coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:827-32.
22. Toyozaki T, Hiroe M, Saito T, Iijima Y, Takano H, Hiroshima K, et al. Levels of soluble Fas in patients with myocarditis, heart failure of unknown origin, and in healthy volunteers. *Am J Cardiol*. 1998;81:798-800.
23. Nishigaki K, Minatoguchi S, Seishima M, Asano K, Noda T, Yasuda N, et al. Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1214-20.
24. Torre-Amione G, MacLellan W, Kapadia S, Weilbaecher D, Farmer J, Young J, et al. Tumor necrosis factor-alpha is persistently expressed in cardiac allografts in the absence of histological or clinical evidence of rejection. *Transplant Proc*. 1998;30:875-7.
25. Chollet-Martin S, Depoix JP, Hvass U, Pansard Y, Vissuzaine C, Gougerot-Pocidal MA. Raised plasma levels of tumor necrosis factor in heart allograft rejection. *Transplant Proc*. 1990;22:283-6.