

Trabajos seleccionados

XXI Congreso Argentino de Cardiología

Identificación *in situ* de apoptosis en biopsias endomiocárdicas durante episodios de rechazo agudo por medio de marcación específica de fragmentos de ADN nuclear

R. LAGUENS, P. CABEZA MECKERT, S. PERRONE, R. FAVALORO

Departamento de Investigación Clínica YCYCC, Fundación Favaloro, Buenos Aires
Trabajo recibido para su publicación: 11/94 Aceptado: 11/94
Dirección para separatas: Belgrano 1746, Buenos Aires, Argentina.

Se pesquisó la presencia de apoptosis de núcleos individuales en biopsias endomiocárdicas de 6 pacientes con trasplante cardíaco por medio de la detección *in situ* de roturas del ADN nuclear por medio de la marcación con duTP biotinilado incorporado con deoxinucleotidil transferasa y se reveló con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. En ninguna de las muestras obtenidas en el momento del trasplante se observaron núcleos apoptóticos, los que se observaron en los miocitos, células endoteliales y del tejido conectivo intersticial en muestras obtenidas entre 7 y 146 días después del trasplante. La variedad y número de células que presentaron núcleos apoptóticos variaron de acuerdo con el grado de rechazo, establecido de acuerdo con la gradación recomendada por la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón. En todos los casos de rechazo 3A (n = 8), en la mitad de los grados 2 (n = 8) y en algunos grado 1B (3/8) se observaron miocitos con núcleos apoptóticos en la vecindad o en el interior de zonas con infiltrado inflamatorio. En los rechazos grado 0 y 1A y en las zonas con efecto "Quilty" no se observaron miocitos con núcleos apoptóticos. Por el contrario, las células endoteliales y conectivas intersticiales presentaron núcleos apoptóticos independientemente del grado de rechazo. Estos resultados indican que durante los episodios de rechazo la apoptosis de los miocitos es uno de los mecanismos de daño inmunológico y que la investigación de este fenómeno en las biopsias endomiocárdicas puede ser de utilidad para el diagnóstico del daño hístico. Rev Arg Cardiol 1995; 63 (3): 241-247.

Palabras clave Apoptosis - Rechazo agudo - Trasplante - Biopsia endomiocárdica

El rechazo agudo del corazón alotrasplantado representa el paradigma de la inmunidad mediada por células, un proceso por medio del cual el daño hístico es producido por linfocitos sensibilizados. El mecanismo propuesto para esa sensibilización consiste en la liberación por células CD4+, activadas por el aloantígeno, de interleukina 2, la que a su vez induce la proliferación de células T CD8+ citotóxicas que producen la posdestrucción de las células trasplantadas que expresen antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. (1)

Los mecanismos de producción de daño hístico por las células que infiltran el corazón alotrasplantado y las alteraciones celulares consecutivas al daño inmunológico no están todavía completamente di-

lucidados. Se ha propuesto que una vez que las células citotóxicas se contactan con sus células diana liberan el contenido de gránulos líticos en el pequeño espacio que separa ambas células. Como las granulaciones de los linfocitos citotóxicos contienen una proteína que forma poros en la membrana plasmática celular, la perforina o citolisina, y enzimas líticas, se postula que estas sustancias dañan la membrana plasmática y producen la muerte celular por lisis osmótica. (2)

Sin embargo, la mayoría de los datos histoquímicos y morfológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que tanto en el rechazo de los injertos, como en las reacciones autoinmunes y las infecciones virales, la muerte celular inducida por mecanismos inmu-

nológicos se lleva a cabo por medio de la inducción de apoptosis. (3) El hecho bioquímico más característico de la apoptosis es la rotura de la cromatina por la acción de endonucleasas. (4) La técnica más frecuentemente empleada para la detección de apoptosis consiste en la extracción del ADN genómico y la pesquisa de múltiples fragmentos de ADN nucleosómico en geles de agarosa. (5) Como este estudio requiere la destrucción de los tejidos, su aplicación a las pequeñas muestras que se obtienen en las biopsias endomiocárdicas no es conveniente, dado que las mismas deben ser procesadas para su examen anatomopatológico con el fin de diagnosticar la presencia de un episodio de rechazo agudo y graduar su intensidad para adoptar las medidas terapéuticas necesarias.

Recientemente se han desarrollado métodos para la detección *in situ* de roturas del ADN nuclear en cortes de tejido, lo que permite el diagnóstico de apoptosis en las mismas muestras que se procesan para el estudio anatomopatológico. (6) El hecho de que por medio de estas técnicas sea posible diagnosticar la presencia de apoptosis en núcleos individuales nos indujo a pesquisar la presencia de roturas del ADN nuclear en biopsias endomiocárdicas de pacientes con trasplante cardíaco, con el fin de indagar si la apoptosis desempeña algún papel en el rechazo agudo y determinar si su diagnóstico puede representar un método más sensible que los actualmente usados para el diagnóstico morfológico del daño celular.

En el presente trabajo presentamos evidencias de que en el corazón humano trasplantado existe apoptosis de algunos miocitos, células intersticiales y endoteliales, y de que la variedad y el número de células que presentan apoptosis están relacionados con la presencia histológica de un rechazo agudo.

MATERIAL Y METODO

Pacientes

Se estudiaron 73 biopsias realizadas a 6 pacientes sometidos a trasplante cardíaco, durante el protocolo de biopsias endomiocárdicas para el diagnóstico de rechazo agudo. Se obtuvieron muestras en el momento del trasplante y hasta 146 días después del mismo. Los especímenes biópsicos se tomaron del tabique del ventrículo derecho mediante el uso de un biótomo introducido en la vena yugular derecha.

Técnica histológica

Los fragmentos de tejido (6 a 8 en cada procedimiento biópsico) se fijaron 2 horas en solución tamponada de formaldehído al 4% y se incluyeron en Histowax. Se obtuvieron cortes de 4-5 μm de espesor que se adhirieron a portaobjetos recubiertos con polilisina para incrementar la adherencia y se secaron a 37°C.

Los cortes se colorearon con hematoxilina y eosina y tricrómico de Gomori. El diagnóstico y graduación del rechazo agudo se realizaron con microscopía de luz de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón. (7)

Detección de apoptosis

Se empleó, con algunas modificaciones, la técnica de Gavrieli, Sherman y Ben-Sasson, (6) basada en la unión de dUTP marcada con biotina a los sitios de rotura del ADN (*buck end labeling*) por medio de la acción de deoxinucleotidil-transferasa terminal. Los cortes se secaron a 60°C durante una hora previo a la hidratación, que se llevó a cabo con xileno, alcohol etílico y agua doblemente destilada. Se emplearon reactivos de grado analítico con el fin de reducir el riesgo de contaminantes que interfirieran con la reacción enzimática. Después de la hidratación se removieron las proteínas de los cortes de tejido por medio de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas K (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.). Después de lavar los cortes repetidas veces con agua destilada, se sumergieron en tampón TDT (30 mM de base Trizma [Sigma], 140 mM de cacodilato de sodio y 1 mM de cloruro de cobalto) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante una hora en atmósfera húmeda a 37°C con 0,3 e.u./ml de deoxinucleotidil-transferasa terminal (TDT) y de dUTP biotinilada (Gibco Co, Grand Island, N.Y.) en tampón TDT. La reacción finalizó transfiriendo los cortes a tampón TB (300 mM de cloruro de sodio y 30 mM de citrato de sodio) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con agua destilada los cortes se cubrieron con 2% de albúmina bovina y se lavaron repetidamente con tampón fosfato salino. La presencia de compuestos biotinilados se demostró con estreptavidina-fosfatasa alcalina empleando un equipo comercial (Biogenex). Como controles se incubaron cortes alternativos con la misma técnica pero sin la incorporación de TDT. Además se investigó apoptosis en cortes de mucosa de intestino delgado, donde las células del extremo de las vellosidades muestran normalmente tal fenómeno. (6)

RESULTADOS

Con la técnica empleada se observó una tinción característica e intensa de los núcleos de los miocitos, del endotelio capilar, de células intersticiales y de elementos de los infiltrados inflamatorios. La tinción estaba circunscripta a células aisladas o a pequeños grupos celulares. Los núcleos aparecían homogéneos y no se observó tinción del área cromatínica.

En los cortes empleados como controles, que fueron incubados sin incorporación de TDT a la reacción, no se observó tinción nuclear.

En los cortes de intestino delgado utilizados como control positivo de la reacción se observaron núcleos apoptóticos en el extremo distal de las vellosidades.

Correlación de la apoptosis con el grado de rechazo

En ninguna de las muestras obtenidas en el momento del trasplante se observaron núcleos coloreados. En las biopsias obtenidas en diferentes tiempos después del trasplante, la presencia de núcleos apoptóticos y su distribución de acuerdo con el tipo celular variaron con el grado de rechazo. En las biopsias de grado 0 ($n = 18$) no se observó tinción de los núcleos de los miocitos. Por el contrario, en los rechazos grado 3A ($n = 8$) todas las biopsias mostraron miocitos apoptóticos. Los miocitos con núcleos coloreados se observaron en el seno de los infiltrados inflamatorios (Figura 1) o en su vecindad. En el examen con el microscopio de interferencia se observó que, si bien algunos de los miocitos apoptóticos presentaban vacuolización citoplásmica y bordes carcomidos, otros aparecían normales. En las áreas biópsicas libres de infiltrados inflamatorios no se observaron miocitos con núcleos coloreados.

En las biopsias endomiocárdicas diagnosticadas como grado de rechazo agudo 1A y 1B ($n = 30$) solamente se observaron miocitos apoptóticos en 3 casos grado 1B. Comparados con el grado 3A, los miocitos con núcleos apoptóticos eran más escasos, existiendo entre 1 a 3 por cada área inflamatoria. En 4/8

biopsias de grado 2 se observaron miocitos apoptóticos en el seno de los infiltrados inflamatorios con una distribución semejante a la de los rechazos 1B.

La prevalencia de apoptosis en las células intersticiales y vasculares fue diferente que en las de los miocitos. En ninguna de las muestras obtenidas en el momento del trasplante se observaron núcleos apoptóticos en el intersticio o en los vasos. En 7/18 biopsias grado 0 se observó ocasionalmente tinción de los núcleos del endotelio capilar y de escasas células conectivas intersticiales dispersas al azar (Figura 2). Una prevalencia similar de células endoteliales e intersticiales apoptóticas se observó en las biopsias endomiocárdicas con grado de rechazo 1A, 1B y 2. Sin embargo, el número de dichas células con núcleos coloreados era mayor que en las biopsias sin evidencia de rechazo, apareciendo tanto en áreas de inflamación como en zonas normales. Una distribución semejante se observó en las biopsias diagnosticadas como grado 3A, pero con una prevalencia mayor (8/8). Además, en áreas fibróticas correspondientes a cicatrices de biopsias previas o de episodios de rechazo anteriores se observaron pequeños capilares y fibroblastos con núcleos intensamente coloreados.

El resultado de la prevalencia de células apoptóticas de acuerdo con el grado de rechazo está sintetizado en la Tabla 1.

Apoptosis y efecto "Quilty"

En las 63 biopsias estudiadas, 8 presentaron efecto "Quilty" B. En ellas se observaron escasas células

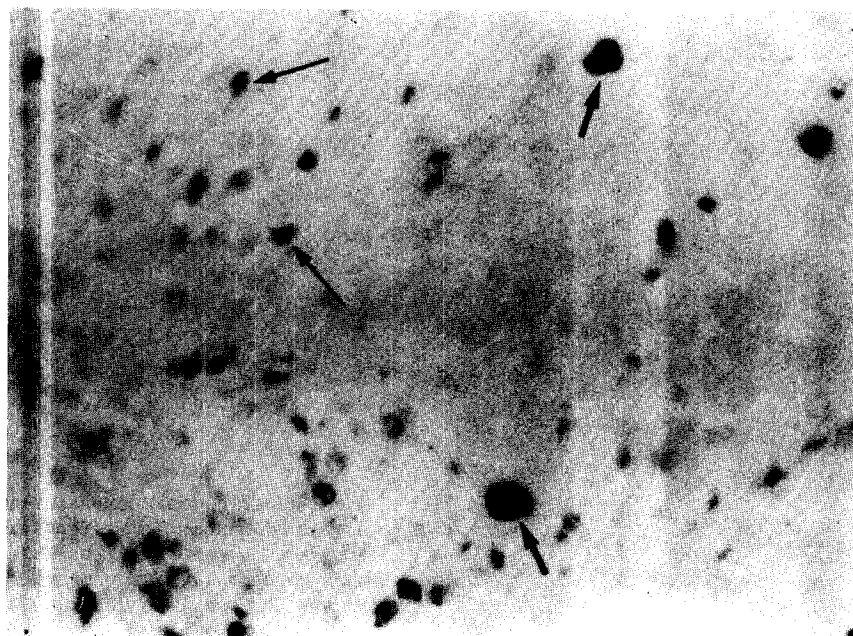


Fig. 1. Rechazo grado 3A mostrando los núcleos coloreados de los miocitos apoptóticos (flechas gruesas) y de células inflamatorias (flechas delgadas). Aumento original 250 X.

Tabla 1
Prevalencia de núcleos apoptóticos en biopsias endomiocárdicas

| Grado de rechazo | Miocitos | Intersticio y endotelio |
|--------------------|----------|-------------------------|
| Día del trasplante | 0/6 | 0/6 |
| Grado 0 | 0/18 | 7/18 |
| Grado 1A | 0/11 | 7/11 |
| Grado 1B | 0/22 | 9/22 |
| Grado 2 | 4/8 | 5/8 |
| Grado 3A | 8/8 | 8/8 |

inflamatorias e intersticiales apoptóticas sin tinción de los núcleos de los miocitos subyacentes, con la excepción de un caso correspondiente a un efecto "Quilty" B en un rechazo grado 3A, en el que se observaron miocitos apoptóticos en un área de infiltrado mononuclear penetrante (Figura 3).

DISCUSION

La biopsia endomiocárdica (BEM) es actualmente el método más confiable para diagnosticar el rechazo agudo del trasplante alogénico del corazón humano. (8) La extensión y calidad del infiltrado inflamatorio y la presencia de muerte o degeneración miocítica con considerados los pilares para el diagnóstico del rechazo agudo en el trasplante de corazón humano. Si bien la evaluación de la calidad y extensión del infiltrado inflamatorio normalmente no presenta dificultades, la injuria miocítica no es siempre evidente a nivel del microscopio de luz. Cuando no existe una ruptura de la integridad celular, o una marcada hipereosinofilia, el diagnóstico de la injuria miocítica está basado en alteraciones imprecisas, como la centralización de las miofibrillas con

sinuosidades de las membranas miocíticas, desorganización de las miofibrillas, vacuolización celular o cambios en la afinidad tintorial de las células afectadas. (9) Estas alteraciones deben estar en el contexto de infiltrados inflamatorios. El microscopio electrónico, que puede dar una evidencia mejor de la necrosis celular, no es un método práctico para el diagnóstico del rechazo agudo, por el tamaño pequeño de las muestras a examinar y el tiempo relativamente largo que demanda la técnica, en una situación que requiere prontitud en el diagnóstico histopatológico para el monitoreo del tratamiento del rechazo. Por otra parte, en algunos estudios no ha sido posible encontrar una evidencia ultraestructural clara de necrosis miocítica, sugiriendo que el daño celular puede ser reversible. (10)

Dado que el rechazo agudo es un proceso inmune mediado por células, el estudio y diagnóstico de los mecanismos de muerte celular que ocurren durante el desarrollo del daño tisular y la búsqueda de evidencias inmunológicas de muerte mediada por células podrían ser útiles para un diagnóstico correcto de los episodios de rechazo. Se han propuesto dos mecanismos como responsables de la muerte celular en las lesiones de origen inmunológico, llamadas necrosis, o muerte accidental, y apoptosis, o muerte programada. Se sostiene que la necrosis es la consecuencia de la liberación por el linfocito citotóxico de granulaciones líticas que contienen una proteína formadora de poros, perforina o citolisina, y enterasas, las que dañan las membranas celulares y provocan la muerte de las células diana por lisis osmótica. (11) El hallazgo de esos mismos productos en los linfocitos cultivados de biopsias endomiocárdicas del momento del rechazo (12) y en las células inflamatorias presentes en las mismas biopsias (13)

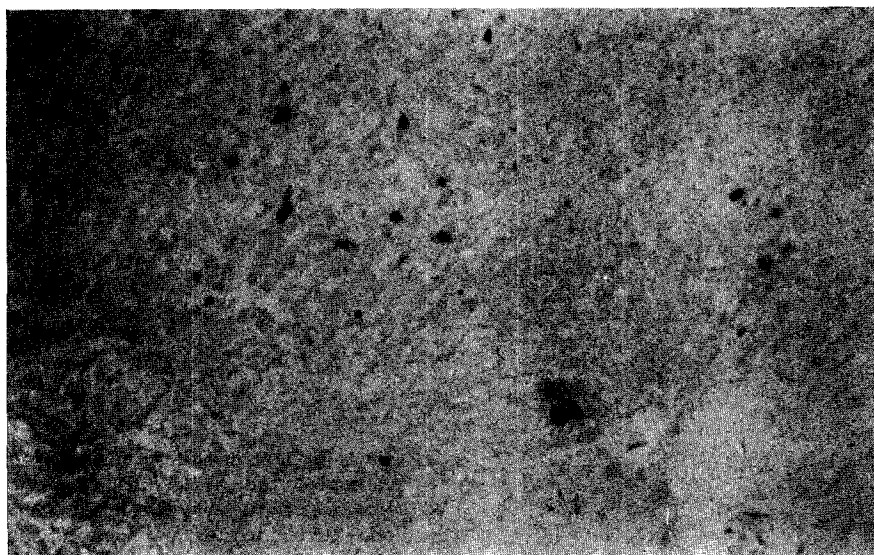


Fig. 2. Imagen con bajo aumento de una biopsia endomiocárdica sin signos histológicos de rechazo. Solamente los núcleos de algunas células intersticiales y endoteliales aparecen coloreados. Aumento original 100 X.

sugiere que este mecanismo de muerte celular actúa en los episodios de rechazo.

El segundo mecanismo de muerte inmunológica, apoptosis, se reconoce a nivel morfológico por medio de la microscopía electrónica de transmisión. Sus características más importantes consisten en la condensación de la cromatina nuclear, la condensación de la matriz citoplásmica y de los organoides y la aparición de expansiones pediculadas de la membrana plasmática, un proceso llamado zeiosis. (14, 15) Con el microscopio de luz la apoptosis no puede diagnosticarse con precisión. A pesar de que la presencia de núcleos con la cromatina condensada y de homogenización citoplásmica con reducción del tamaño celular puede ser considerada sugestiva de apoptosis, otras condiciones patológicas tales como la hipoxia pueden producir alteraciones similares de los miocitos. Como el fenómeno bioquímico más característico de la apoptosis es el clivaje de la cromatina por la activación de endonucleasas, la pesquisa de fragmentos de DNA es un método confiable para su diagnóstico. La técnica empleada en el presente trabajo, marcando *in situ* las roturas de DNA nuclear en biopsias procesadas para estudios histopatológicos rutinarios, permite la identificación individual de células apoptóticas. Además, dado que la rotura de la cromatina es un proceso dinámico y prolongado, estas técnicas permiten la identificación de células en proceso de apoptosis, pero que todavía no muestran evidencias morfológicas de daño.

Nuestros resultados muestran que la presencia de células apoptóticas en el corazón está asociada con el trasplante. En ninguna de las muestras obtenidas de los corazones dadores en el momento del trasplante, así como tampoco en las biopsias endomiocárdicas de pacientes con diferentes afecciones cardíacas (cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, fibrosis subendocárdica y amiloidosis), hemos encontrado núcleos apoptóticos. En las biopsias de corazones trasplantados se encontraron núcleos apoptóticos tanto en los miocitos como en las células endoteliales e intersticiales. La presencia de miocitos apoptóticos fue coincidente con la evidencia histológica de rechazo. En ninguna de las biopsias diagnosticadas como grados 0 y 1A se hallaron miocitos apoptóticos. Por el contrario, en los casos diagnosticados como rechazos grado 1B, 2 y 3A se encontraron miocitos apoptóticos pero con una prevalencia diferente de acuerdo con el grado de rechazo. Mientras todos los casos 3A mostraron miocitos apoptóticos, los mismos estaban presentes solamente en unos pocos casos de rechazo 1B y en la mitad de los grado 2. Esta observación sugiere que en algunos casos diagnosticados como grado 1B por la ausencia de necrosis miocítica en las técnicas histológi-

cas de rutina, existe daño inmunológico de los miocitos. Por el contrario, algunos de los casos diagnosticados grado 2 sobre la base del daño miocítico, aparentemente no muestran evidencia de apoptosis. De acuerdo con lo esperado, el efecto "Quilty" no estuvo relacionado con apoptosis miocítica. El hecho de que el único caso de efecto "Quilty" positivo haya coincidido con un episodio de rechazo grado 3A hace suponer que se trataba de un rechazo subendocárdico más que un auténtico efecto "Quilty". Sin embargo, dado que algunas veces existen dificultades para distinguir el efecto "Quilty" del rechazo, la investigación de apoptosis podría ser de utilidad para realzar el diagnóstico diferencial.

A diferencia de los miocitos, que mostraron apoptosis solamente en los rechazos 1B, 2 y 3A, la apoptosis de las células endoteliales capilares y conectivas intersticiales estuvo presente en la mitad de los rechazos grados 0 y 1A, además de observarse en la mitad de los rechazos 1B y 2 y en todos los rechazos grado 3A. Si se tiene en cuenta que no se encontró apoptosis de esas células en las biopsias endomiocárdicas obtenidas en el momento del trasplante, parece razonable suponer que este fenómeno está vinculado con el trasplante. Sin embargo, el hecho de que la apoptosis de las células endoteliales y conectivas fuese observada en las muestras sin evidencia histológica de rechazo induce a suponer que este fenómeno no está vinculado con el rechazo mediado por células. Con los estudios realizados en el presen-

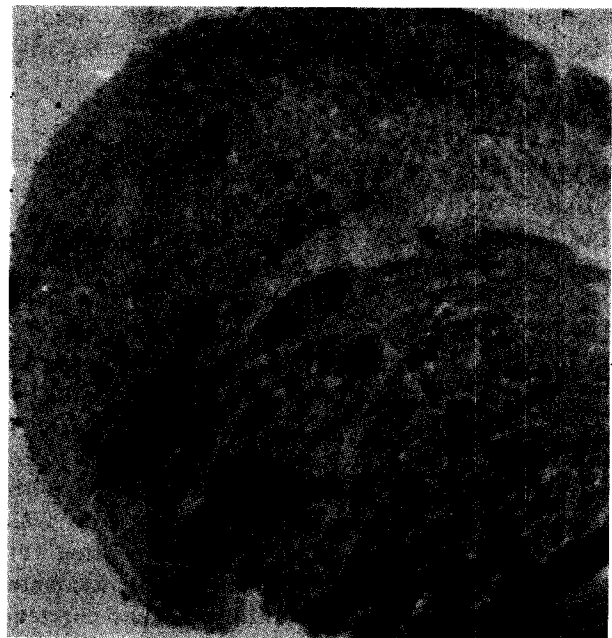


Fig. 3. Efecto "Quilty" B mostrando una tinción intensa de los núcleos del infiltrado inflamatorio y de algunos miocitos subendocárdicos. Aumento original 100 X.

te trabajo no es posible establecer si la apoptosis de las células endoteliales y conectivas es la consecuencia de la inmunidad humoral o de las drogas empleadas para la inducción de inmunosupresión. Es sabido que los corticosteroides inducen la apoptosis de los linfocitos (17) y la ciclosporina A la previene. (18) Según nuestro conocimiento, no existen estudios acerca de la acción de esas drogas sobre las células cardíacas.

La información disponible indica que en el corazón trasplantado operan dos mecanismos de muerte celular, apoptosis y lisis osmótica, al parecer más complementarios que antagónicos en la citotoxicidad mediada por células. Uno, dependiente de una señal de contacto transmembrana plasmática, y el otro de la exocitosis de material tóxico por linfocitos efectores. (18) La observación de que los linfocitos CD4+ y CD8+ poseen mecanismos de citotoxicidad dependiente e independiente de las granulaciones apoya esta opinión.

A pesar de que el número relativamente pequeño de casos del presente trabajo impide obtener conclusiones definitivas, es nuestra opinión que la investigación de la presencia de apoptosis en los miocitos puede ser un medio útil para el diagnóstico de daño celular y para establecer variedades dentro de los grados bajos de rechazo, permitiendo de esta manera la adopción de medidas terapéuticas.

Dentro de la misma línea de razonamiento, la investigación de apoptosis por técnicas *in situ* podría ser un medio eficaz para el diagnóstico anatomopatológico de miocarditis en la que el daño miocítico es el requisito exigido para diferenciar entre una miocarditis establecida y una fronteriza (*borderline*). (20)

SUMMARY

APOPTOSIS: "IN SITU" IDENTIFICATION BY NUCLEI DNA FRAGMENTS-SPECIFIC TAGGING, IN ENDOMYOCARDIAL BIOPSIES DURING EPISODES OF ACUTE REJECTION

The presence of apoptosis in individual nuclei of endomyocardial biopsies from 6 patients with allogeneic heart transplant was demonstrated by means of the detection *in situ* of nuclear DNA breaks. Biotinylated dUTP incorporated with deoxynucleotidyl transferase and revealed with alkaline phosphatase-labeled streptavidin was employed. None of the samples at the moment of transplant presented apoptotic nuclei, which were observed in the myocytes, endothelial and connective tissue interstitial cells of the biopsies, obtained between 7 and 146 days after transplant. The kind and number of cells with apoptotic nuclei was different according to the rejection grade (Grading

of the ISHLT). All the rejection grade 3A (n = 8), half of the rejection grade 2 (n = 8) and some of the rejection grade 1B (3/8) biopsies showed myocytes with apoptotic nuclei within or in the neighborhood of the inflammatory infiltrates zones. In the rejection grades 0 and 1A, and in "Quilty" effect areas, no myocytes with apoptotic nuclei were observed. On the contrary, in the endothelial and connective tissue cells, apoptotic nuclei were observed in all the rejection grades. These results indicate that during the acute rejection episodes myocyte apoptosis is one of the mechanisms of immunological damage and that its recognition may represent a useful tool for the demonstration of myocyte damage in endomyocardial biopsies.

Key words Apoptosis - Acute rejection - Transplant - Endomyocardial biopsy

BIBLIOGRAFIA

1. Hutchinson IV. Effector mechanisms in transplant rejection: an overview. *En: Rose ML, Yacoub MH (eds). Immunology of heart and lung transplantation. London, Edward Arnold, 1993: 3-21.*
2. Griffiths GM, Namikawa R, Meuller C y col. Granzyme A and perforin as markers of rejection in cardiac transplantation. *Eur J Immunol 1991; 21: 687-693.*
3. Cohen JJ, Duke RC. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann Rev Immunol 1992; 10: 267-293.*
4. Russl JH, Masakowsky VR, Rucinsky T, Phillips G. Mechanisms of immune lysis 3. Characterization of the nature and kinetics of the cytotoxic T lymphocyte-induced nuclear lesion in the target. *J Immunol 1982; 128: 2087-2094.*
5. Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ. Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 6361-6365.*
6. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol 1992; 119: 493-501.*
7. Billingham ME y col. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: heart rejection study group. *J Heart Transplant 1990; 9: 587-593.*
8. Billingham ME. Histological diagnosis of acute heart rejection. *En: Rose ML, Yacoub MH (eds). Immunology of heart and lung transplantation. London, Edward Arnold, 1993: 140-151.*
9. Zerbe TR, Arena V. Diagnostic reliability of endomyocardial biopsy for assessment of cardiac allograft rejection. *Human Pathol 1988; 19: 1307-1311.*
10. Myles JL, Ratliff NB, McMahon JT y col. Reversibility of myocyte injury in moderate and severe rejection in cyclosporine-treated cardiac transplant patients. *Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 947-952.*
11. Smith MJ, Ortaldo JR. Mechanisms of cytotoxicity used by human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell subsets: The role of granule exocytosis. *J Immunol 1993; 151: 740-757.*
12. Sitters AJ, Rose ML, Domínguez MY, Yacoub MH. Selection of donor specific cytotoxic lymphocytes within the allografted human heart. *Transplantation 1990; 49: 105-110.*
13. Carlquist JF, Greenwood JH, Hammond EH y col. Phenotype and serine esterase production of human cardiac allograft-infiltrating lymphocytes. *J Heart Lung Transplant 1993; 12: 748-755.*
14. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death.

- J Pathol 1971; 105: 13-20.
15. Sanderson CJ, Glauert AM. The mechanism of cell mediated cytolysis. Morphological studies by electron microscopy. Proc R Soc London Ser B 1977; 198: 315-323.
 16. Willie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation. Nature 1980; 284: 255-256.
 17. Dutz JP, Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. A role for calcineurin in degranulation of murine cytotoxic T-lymphocytes. J Immunol 1993; 150: 2591-2598.
 18. Squier MKT, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. Current Opinion in Immunology 1994; 6: 447-452.
 19. Zychlinsky A, Zheng L, Liu CC, Young JD. Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells. J Immunol 1991; 146: 393-400.
 20. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD y col. Myocarditis: histopathological definition and classification. Am J Cardiovasc Pathol 1987; 1: 3.