

20/71

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA
DE MITOCONDRIAS CARDIACAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

QUILLERMINA GARCIA RIVERA

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pág.
I RESUMEN	6
II INTRODUCCION	9
III OBJETIVOS	18
IV MATERIAL Y METODOS	20
V RESULTADOS	41
VI DISCUSION	85
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	95

Abreviaturas

- FMC.- Fracción Mitocondrial Cruda.
- FMP.- Fracción Mitocondrial Pura.
- a-FMC.- Anticuerpos anti-Fracción Mitocondrial Cruda.
- a-FMP.- Anticuerpos anti-Fracción Mitocondrial Pura.
- ACF.- Adyuvante Completo de Freund.
- SC.- Subcutánea.
- IP.- Intraperitoneal.
- MDI.- Microdoble inmunodifusión.
- CIE.- Contraelectroforesis.
- IEF.- Inmunolectroforesis.
- SSTE.- Solución de Sacarosa 0.25 M, tris 4.9 mM, EDTA 0.001 M,
pH 7.4 .
- SSB.- Solución Salina Borato.
- T-X-U.- Tritón X-100 al 0.1% y Urea 0.1 M.
- SMG-Pi.- Solución reguladora de Malato 0.1 M, pH 7.3; Glutamato 0.1 M, pH 7.3; Cloruro de potasio 3 M; Fósforo -- inorgánico 0.1 M, pH 7.3 .
- ADP.- Adenosín-difosfato.
- ASCH.- Antígeno Soluble de Corazón Humano.
- SHN.- Suero Humano Normal.
- ASCP.- Antígeno Soluble de Corazón de Perro.
- SH.- Suero de Perro.

I RESUMEN

Se estudiaron los anticuerpos contra mitocondrias en pacientes con daño cardiaco, debido a que se han observado experimentalmente a los 12 días post-infarto provocado en perros anticuerpos antimitocondriales. Además basandose en que algunos antígenos de mitocondrias son comunes a varias especies, se emplearon las mitocondrias del corazón de perros en los estudios inmunoserológicos.

Por contraelectroforesis se encontraron anticuerpos antimitocondriales en el 33% de los sujetos cardiopatas.

En la población estudiada se encontró un porcentaje de positividad promedio de 28.9 por contraelectroforesis y de 1.9 por microdoble inmunodifusión; las diferencias en los dos métodos pueden ser debidas a que la sensibilidad de la CIE es mayor y también a las características fisicoquímicas de los antígenos.

En estudios al microscopio electrónico se mostró que la preparación mitocondrial estaba contaminada con otros organelos, por lo que los pacientes cardiopatas tuvieron anticuerpos contra una fracción subcelular "enriquecida" con mitocondrias, aunque no se puede descartar la presencia de anticuerpos contra otros organelos cardiacos.

Los anticuerpos antimitocondriales de corazón de pe -

rro presentaron reacción cruzada con antígenos mitocondriales de hígado y músculo esquelético de perro y con antígenos mitocondriales de corazón, hígado y músculo de rata y gallo.

Los anticuerpos antimitocondriales modificaron el consumo de oxígeno de las mitocondrias y alteraron su estructura al provocar "hinchamiento" en las mismas.

II INTRODUCCION

MITOCONDRIAS

Generalidades.

Las mitocondrias son organelos que se encuentran en el citoplasma de las células. Desempeñan funciones metabólicas importantes para la célula, tales como la biosíntesis de ATP o fosforilación oxidativa, la cual es fundamental para todos los procesos de la vida celular en los organismos aerobios, ya que es la principal fuente de energía, también realiza el ciclo tricarboxílico de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos, transporte de iones y metabolismo de algunos aminoácidos (41).

Se caracterizan por una serie de propiedades morfológicas, bioquímicas y funcionales; entre éstas se hallan la forma y tamaño, la organización estructural y funcional, la organización lipoproteica y el contenido de una gran batería de enzimas y coenzimas que trabajan de manera integrada para producir transformaciones energéticas celulares.

Fisiológicamente se consideran como verdaderas fábricas que producen la energía necesaria para que la célula lleve a cabo sus múltiples funciones, como los trabajos mecánicos (motilidad, contracción), eléctricos (transmisión de impulsos), químicos (biosíntesis de materiales celulares) y osmóticos (transporte activo), que constituyen los procesos vi-

vos de los organismos.

El número de mitocondrias por células varía entre 5 y 20×10^5 , según el organismo de que se trate.

Morfología y Bioquímica.

La mitocondria está formada por una membrana externa lisa y una membrana interna rugosa formada por pliegues o invaginaciones llamadas crestas y dentro de la membrana interna está la matriz. Sus dimensiones generalmente son de 3 micras de largo por 1 micra de ancho.

Membrana interna: contiene los citocromos b, c, c_1 , a, a_3 y la ATPasa F_1 , asociados con el mecanismo de la fosforilación oxidativa, así como ciertas deshidrogenasas, en particular las del succinato y las del NADH. Es rica en cardiolipina, al igual que las membranas celulares de las bacterias.

Membrana externa: contiene enzimas ausentes en la membrana interna, como la monoamino-oxidasa, que es una flavoproteína que cataliza la oxidación de diversas monoaminas, la reductasa de citocromo b_5 y otras.

Matriz: contiene cerca del 50% de proteína, la mayor parte de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos,

la malato y la glutamato-deshidrogenasa, DNA y RNA polimerasa, sugiriendo éstos últimos una participación en mecanismos hereditarios extracromosómicos.

La mitocondria experimenta grandes cambios de volúmen y de organización durante los cambios de actividad respiratoria.

El espacio entre las membranas contiene enzimas específicas particularmente la adenilato-quinasa (15).

El principal producto de la actividad bioquímica de las mitocondrias es el ATP (adenosín-trifosfato), cuya molécula almacena la energía requerida por las células y constituye una fuente de energía. Este transportador universal de energía actúa transfiriendo su fosfato terminal energeticamente rico a otras moléculas, se forma por la transformación de energía de oxidorreducción a partir del ADP (adenosín-difosfato) y fósforo inorgánico.

La formación del ATP se realiza a través de etapas -- del proceso de ruptura y oxidación de las principales sustancias alimenticias de la célula (hidratos de carbono, lípidos y proteínas).

El ATP se forma durante la glucólisis en la que por acción de una serie de enzimas en el citoplasma de la célula se degradan los alimentos en unidades de dos carbonos, que se

unen a la coenzima A (acetil-coenzima A); sin embargo la mayor parte del ATP se forma durante el proceso de la fosforilación-oxidativa en las mitocondrias, una vez que la acetil-coenzima-A penetra en la mitocondria, el piruvato entra en el ciclo tricarbónico de Krebs y después de una serie de pasos en los -- que intervienen varias enzimas, se descarboxila dando CO_2 y en varios puntos del ciclo por la acción de deshidrogenasas son -- extraídos los pares de electrones que penetran en la cadena -- respiratoria o sistema transportador de electrones a través -- del NADH que es el principal intermediario entre el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa.

Los principales componentes de la cadena fosforilativa son flavoproteínas, la coenzima Q, los citocromos y aceptor final que es el O_2 para formar H_2O . La energía de oxidorreducción se transforma en energía del enlace fosfato en tres -- puntos de la cadena de transportadores electrónicos que conducen desde el NADH hasta el O_2 .

En estos pasos se libera la suficiente energía para -- producir una molécula de ATP a partir del ADP y el P_i .

Fósforo/oxígeno= 3 ATP. Por cada molécula de piruvato que se oxida completamente, se forman 12 moléculas de ATP.

Inmunología.

La respuesta inmune a los antígenos cardíacos se em -

pezó a estudiar desde 1937 por Brockman y posteriormente por Cavelti quien demostró que en el 75% de pacientes con fiebre reumática activa, se presentaron anticuerpos contra corazón, (9).

En estudios previos se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra antígenos cardíacos en pacientes con infarto del miocardio y con fiebre reumática mediante análisis inmunoserológico, (34).

En el infarto del miocardio provocado experimentalmente en perros se han demostrado anticuerpos contra mitocondrias que se detectan a los 5 días post-infarto, (26).

En algunas enfermedades cardiovasculares, como en la isquemia del miocardio, se presenta un trastorno de la capacidad metabólica en la célula y se encuentran alterados varios parámetros incluyendo los relacionados con el aporte de energía (ATP) por las mitocondrias.

En los sujetos con cirrosis biliar primaria se demostraron anticuerpos antimitocondrias en el 90% de los casos -- (16), los cuales se detectan por pruebas de fijación de complemento y por inmunofluorescencia; éstos anticuerpos no son específicos de especie o de órgano.

No se observa una correlación entre los anticuerpos antimitocondriales y el cuadro clínico o histopatológico de --

cirrosis (21), debido probablemente a la diferente especificidad de los autoanticuerpos, por estudios de fijación de complemento se ha concluido que el antígeno mitocondrial en la cirrosis biliar primaria es una lipoproteína localizada en la membrana interna de las mitocondrias, especialmente en aquellas células relacionadas con una alta actividad energética.

La membrana interna de las mitocondrias puede tener un antígeno de reacción cruzada con algunos virus y bacterias, lo que explicaría la presencia de anticuerpos antimitocondriales en enfermos infectados, (6).

Los anticuerpos contra mitocondrias cardiacas pueden encontrarse "naturalmente" en las ratas y reaccionan contra la membrana interna y externa de las mitocondrias (14), sin embargo, se desconoce contra cual determinante antigénico están dirigidos los anticuerpos y tampoco se sabe si en éstas ratas -- se encuentran alteraciones en las mitocondrias cardiacas o en otros órganos. Los autoanticuerpos pueden ser de clase IgM, IgG o IgA y el método más sensible para detectarlos parece ser la inmunofluorescencia, (17).

Se demostró que el autoantígeno en el infarto experimental del perro parece corresponder a una estructura de la membrana interna de la mitocondria, sin embargo también los anticuerpos se unen a la membrana externa. Se presenta una reac-

ción cruzada entre las mitocondrias de corazón y del músculo esquelético, pero no hay reacción cruzada con las mitocondrias del hígado, lo que señala que éstos anticuerpos están dirigidos contra un antígeno(s) específico(s) de las mitocondrias de corazón.

Los estudios realizados en humanos, para establecer cual es el antígeno(s) cardiaco implicado en la inducción de anticuerpos anticorazón, permitieran conocer si existen autoantígeno(s) de mitocondria (34). Tampoco se sabe si hay reacción cruzada entre los antígenos del sarcolema y de las mitocondrias.

Por otro lado los anticuerpos son capaces de modificar la actividad enzimática, ya sea aumentandola o disminuyendola, aunque existen anticuerpos que no alteran la actividad de algunas enzimas; además en el sistema de eritrocito y anticuerpos antieritrocito, se encuentra una modificación del transporte de cationes cuando se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo en la superficie externa del eritrocito, lo cual permite tener un modelo experimental para valorar el transporte activo de Na y K, (29).

Estos estudios se podrían extrapolar a lo que ocurre en el daño de la fibra cardiaca, mediado por una respuesta inmune, especialmente si los anticuerpos están dirigidos-

contra las membranas celulares.

Debido a ésta información es importante dilucidar si las mitocondrias son el antígeno(s) cardiaco(s) que participa en los fenómenos inmunológicos implicados en la respuesta autoinmune contra el corazón en enfermedades tales como la fiebre reumática activa, fiebre reumática inactiva, infarto e isquemia del miocardio y otras, ya que en el Instituto Nacional de Cardiología de 1954 a 1974 se estudiaron 106714 personas, de las cuales el 20% tuvieron fiebre reumática y el 16% insuficiencia coronaria e infarto del miocardio.

III OBJETIVOS

- 1.- Caracterizar inmunologicamente a las mitocondrias.
- 2.- Determinar si existen antígenos mitocondriales --- de reacción cruzada en diferentes tejidos (corazón, hígado y -- músculo esquelético) del perro, de la rata y del gallo.
- 3.- Determinar si la unión antígeno-anticuerpo en el - sistema mitocondrial produce cambios bioquímicos y estructura - les que modifiquen la función de la célula cardiaca.
- 4.- Estudio de la frecuencia de los anticuerpos con -- tra mitocondrias en el suero de pacientes con fiebre reumáti -- ca, infarto del miocardio, cardiopatías congénitas, otras afec -- ciones cardiacas, donadores de sangre y estudiantes universita -- rios.

IV MATERIAL Y METODOS

1. Aislamiento de mitocondrias.

A) Obtención de mitocondrias por centrifugación diferencial.

Se sacrificaron por choque eléctrico varios perros, - Canis familiaris, cuyo peso fue de 12 a 15 Kg, tanto hembras - como machos; se les extrajo el corazón, el cual se colocó en - un recipiente a 4°C, se abrieron las cavidades cardiacas para - eliminar la mayor parte del tejido conectivo, válvulas y gran - des vasos, se enjuagó varias veces con agua destilada, se cor - tó el músculo en trozos de 3 mm³ aproximadamente. Posteriormen - te se procesó de 2 maneras diferentes:

a) Los fragmentos del músculo cardiaco se lavaron dos veces con una solución reguladora de sacarosa 0.25 M, tris -- 4.9 mM, pH 6.8 y se añadieron 3 ml de ésta solución por cada - gramo de tejido, se trituraron en una licuadora a baja veloci - dad durante 5 min, se filtró a través de tres capas de gasa, - luego se pasaron por una homogeneizador de pistón (Eberback) - dos veces. El homogenado se centrifugó a 3000 rpm, 10 min, a - 5°C (centrifuga Beckman J-21B, rotor JS-13), el sobrenadante - se centrifugó a 7000 rpm, 10 min y el botón resultante se resus - pendió en 50 ml de solución reguladora, después se repitió -- la centrifugación a 7000 rpm, 10 min y finalmente el botón se - resuspendió en 6 ml de la solución amortiguadora.

b) Los fragmentos del músculo cardiaco se cortaron -- finamente y se molieron en un mortero que contenía arena purificada (Merck) en relación 1:1(p/p), se agregó solución de sacarosa 0.25 M, tris 4.9 mM, EDTA 0.001 M, pH 7.4 (SSTE). Se -- mezcló el tejido con la arena, se separó el sobrenadante -- por decantación y se centrifugó a 2500 rpm, 10 min, a 5°C (rotor de ángulo fijo JA-20), el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 9000 rpm, 10 min y el botón se resuspendió cuidadosamente en SSTE con un tubo frío y una pipeta graduada, -- luego se centrifugó a 9000 rpm, 10 min y el botón obtenido se llevó a 6 ml con SSTE, Cleland (12).

En cada paso previo a la centrifugación, se ajustó -- el pH a 7.4 con solución de tris 0.1 M ácida o básica.

Las fracciones obtenidas por ambos procedimientos se almacenaron en alícuotas de 1.2 ml a -20°C y se determinó la concentración de proteína total por el método de Lowry (33).

A las mitocondrias así obtenidas se les denominó "fracción mitocondrial cruda" (FMC).

B). Purificación de mitocondrias por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Se preparó sacarosa al 10, 20, 30, 40 y 50%, con una solución de tris 0.01 M, pH 7.4 y se depositaron secuencialmente 8.2 ml de cada concentración en los tubos de centrifuga, ---

quedando la del 50% en el fondo del tubo.

En la capa superior del gradiente se depositaron -- 1.5 ml de FMC y se centrifugó a 12500 rpm, 2 horas, a 5°C -- (rotor de colompio JS-13). Se obtuvieron 2 fracciones mitocondriales:

FMP-ligera.- que se encontró entre las capas del 40 - y 50% de sacarosa.

FMP-pesada.- se obtuvo en el botón formado en el fondo del tubo.

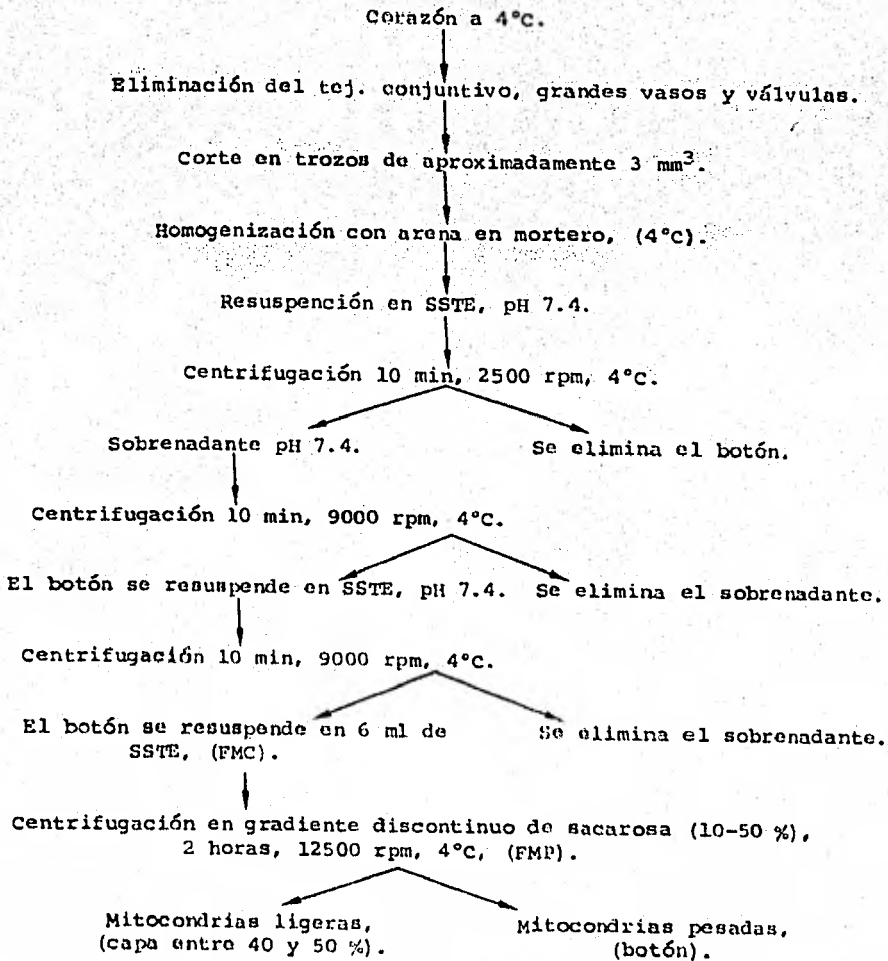
Ambas fracciones se congelaron en alicuotas de 1.2 ml y se determinó la concentración de proteína.

A la fracción obtenida por gradiente de sacarosa se le llamó "fracción mitocondrial pura" (FMP).

La metodología empleada en la obtención de las mitocondrias, se resume en el cuadro 1.

Las FMC y FMP, se observaron por microscopía de fase-contrastada (C. Zeiss) y electrónica (Hitachi).

Cuadro 1

Procedimiento para la obtención de mitocondrias.

C) Determinación de proteína total por el método de Lowry (31).

Se preparó una curva patrón con una solución de albúmina sérica bovina (Sigma), con diluciones que tuvieran una concentración de 110, 55, 37.5, 13.7 y 6.8 mg/0.1 ml. Las muestras problema se diluyeron : 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80, con una solución reguladora de boratos, la que se preparó de la forma siguiente:

Solución salina borato, 0.15 M, pH 8.4, (SSB):

Acido bórico 6.184 g

Borato de sodio .10 H₂O 9.536 g

Cloruro de sodio 4.384 g

Agua destilada aforar a 1000 ml

El pH de la solución se ajustó a 8.4 con HCL o NaOH 1 N. Posteriormente se mezclaron 5 partes de la solución de boratos con 95 partes de cloruro de sodio 0.15 M.

Se prepararon las siguientes soluciones para la determinación de proteínas:

Sol. A:

Tartrato de sodio al 2% 0.1 ml

Sulfato de cobre al 1% 0.1 ml

Carbonato de sodio al 2% 10.0 ml

Sol. B:

Reactivo de fenol (Folín-Ciocalteu) 1.0 ml

Agua destilada

1.0 ml

Se tomó 0.1 ml de las diluciones de albúmina y de las muestras problema por duplicado, se agregaron 2.0 ml de la sol. A y se dejó en reposo 10 min, después se adicionaron 0.2 ml de la sol. B, se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. La densidad óptica se midió en un fotocolorímetro (Coleman Junior 11 A) a 750 nm de longitud de onda.

2. Solubilización de mitocondrias con tritón X-100 y urea.

A 1.0 ml de FMC obtenida con arena (6.5 mg/ml), se le agregó 1.0 ml de tritón X-100 al 0.1% y urea 0.1 M: se agitó e incubó 30 min y se dejó a 4°C durante 24 horas.

El grado de solubilización de las mitocondrias fue -- evaluado por microdoble inmunodifusión (MDI).

Se prepararon dos tipos de placas:

a) Agar al 1.5% se disolvió en SSB, con azida de sodio 1 mg/ml y se depositó en portaobjetos con moldes de lucita, se dejó solidificar por 30 min y se guardó en una cámara húmeda a 4°C.

b) Agar al 1.5% se disolvió en solución de tritón X-100 0.1% y urea 0.1 M, con 1.0 mg/ml de azida de sodio y se procedió de la forma señalada en el inciso anterior.

En ambos tipos de placas se colocaron 50 μ l de antígeno en los pozos periféricos en 50 μ l de anticuerpo anti- --

fracción mitocondrial cruda (a-FMC), en el pozo central.

Se probaron los siguientes antígenos:

- a) Fracción Mitocondrial Cruda, (FMC).
- b) Fracción Mitocondrial Cruda solubilizada, (FMC-solubilizada)
- c) Antígeno Soluble de Corazón Humano, (ASCH).
- d) Antígeno Soluble de Corazón de Perro, (ASCP).
- e) Suero Humano Normal, (SHN).
- f) Suero de Perro, (SP).

Se dejaron difundir las placas en una cámara húmeda - a temperatura ambiente durante 3 días, posteriormente se lavaron 3 días con SSB haciéndose 3 cambios, en agua destilada por 2 horas y se tificaron por 15 min con azul brillante preparado - de la forma siguiente:

Azul de Coomassie R-250 (ICI)	2.5 g
Acido acético	9.2 ml
Alcohol metílico	454.0 ml

La mezcla se agitó durante 24 horas a 20°C en un -- frasco color ámbar y se filtró.

El exceso de colorante se eliminó con varios cambios- de solución decolorante:

Acido acético	5.0 ml
Metanol	5.0 ml

Glicerina	1.0 ml
Agua destilada	89.0 ml

Después de obtener las bandas contrastadas, se secaron las laminillas a 45°C y se enumeraron las bandas.

3. Obtención y purificación de la fracción de gammaglobulina de conejo anti-mitocondrias de perro.

A. Inmunización.

Se inmunizaron 4 conejos de Nueva Zelanda (Oryctolagus cuniculus), de aproximadamente 3 Kg de peso. La FMC y -- FMP se emulsificaron cada una por separado con adyuvante completo de Freund (emulsión de aceite mineral 8.5 ml, arlacel -- 1.5 ml y 50 mg de Mycobacterium butyricum) volumen a volumen.

Cada conejo se inyectó, en cuatro sitios del dorso -- con 0.5 y 1.0 mg de mitocondrias, por vía subcutánea (SC). -- Posteriormente se aplicó la misma cantidad de antígeno sin adyuvante por SC cada 7 días por cuatro veces y a los 7 días -- siguientes se inmunizó por vía intraperitoneal (IP), una semana después se obtuvieron de 30 a 40 ml de sangre por la vena marginal de la oreja. Se dejó coagular la sangre una hora a 37°C y se centrifugó a 1500 rpm, 20 min a 4°C, el suero obtenido se almacenó en alícuotas de 1.0 ml a -20°C hasta el momento de su uso.

Las inmunizaciones se repitieron para obtener sueros hiperinmunes tanto contra FMC como FMP.

El siguiente cuadro indica las condiciones bajo las cuales se inmunizaron los conejos.

Cuadro 2.

Esquema de inmunización con FMC o FMP, para obtener los anti -
sueros.

<u>Día</u>	<u>Mitocondrias (mg/ml)</u>	<u>Vía</u>	<u>Inmunización</u>
0	1.0 + 1.0 ml ACF	SC	I
11	1.0	SC	II
18	1.0	SC	III
25	1.0	SC	IV
32	1.0	IP	V
39	Primer sangrado		
47	1.0	IP	VI
55	Segundo sangrado		
91	1.0	IP	VII
98	Tercer sangrado		
109	1.0	IP	VIII
116	Cuarto sangrado		
126	1.0	IP	IX
133	Quinto sangrado		
186	1.0	IP	X
193	Sexto sangrado		

B. Purificación de gammaglobulina antimitocondrial (8).

La fracción de gammaglobulina se precipitó con sulfato de amonio al 33% de saturación de la siguiente manera:

1. Con NaOH 2N se ajustó la solución saturada de sulfato de amonio a pH 7.8.

2. A 22.0 ml de los sueros a-FMC y a-FMP, se les adicionaron lentamente y con agitación constante 11.0 ml de sulfato de amonio saturado pH 7.8, durante 60 min, a 20°C.

3. Se centrifugó a 8000 rpm, 15 min a 20°C y los precipitados se reconstituyeron en 22.0 ml de SSB.

4. Se repitieron los pasos 1, 2, 3 y los botones de la última centrifugación se disolvieron en SSB, hasta alcanzar 7.33 ml.

5. Las gammaglobulinas se dializaron con SSB a 4°C, manteniéndose en agitación constante, se hicieron varios cambios de SSB, hasta eliminar completamente el sulfato de amonio, lo cual se comprobó con $BaCl_2$ al 10%, en HCL 0.5N.

6. Al finalizar la diálisis se centrifugó a 2500 rpm, 10 min a 4°C para eliminar precipitados inespecíficos.

7. Se determinó la concentración de proteína y se almacenaron en alícuotas de 1.0 ml a -20°C.

Las gammaglobulinas obtenidas a-FMC y a-FMP se probaron por MDI, inmunoelectroforesis (IEF) y contraimmunoelectro-

foresis (CIE).

La MDI se realizó como se señaló anteriormente.

4. Técnicas de precipitación.

Inmunolectroforesis. Se realizó de acuerdo al método de Grabar y Williams (19), con ligeras modificaciones.

Placas de agar al 1.5%:

Agar	1.5 g
Sol reguladora de tris barbital 0.02 M, pH 8.6	50.0 ml
Azida de sodio	100.0 mg
Agua destilada	50.0 ml

Se colocaron 3 ml de agar fundido en cada portaobjeto y se dejaron solidificar a 20°C, se guardaron en cámara húmeda a 4°C, durante 24 horas.

La electroforesis se realizó en una cámara conteniendo solución amortiguadora de tris barbital, pH 8.6. Se depositaron 50 y 10 μ l en los pozos de FMC y FMP, como indicador de movilidad electroforética se utilizó azul de bromofenol unido a la albúmina sérica bovina, la cual se dejó migrar 1.5 cm hacia el cátodo, por cada portaobjeto se aplicaron 2 mA, para realizar la separación electroforética.

Posteriormente se cortaron canales de 2 por 65 mm entre los pozos y se colocaron 100 μ l de suero y gammaglobulina de conejo a-FMC y a-FMP, luego se incubaron en una cámara húmeda a 20°C durante 48 horas para realizar la inmunodifusión. Después las placas se lavaron 3 días con SSB haciendo un cambio diario, con agua destilada durante 2 horas y se secaron --

cubriendolas con papel filtro a 40°C, se tificaron con azul brillante de coomassie 15 min, se contrastaron las bandas con solución decolorante y se secaron a 40°C. Finalmente se registraron las bandas de precipitación.

Contrainmunolectroforesis.

Placas de agarosa al 0.6%:

Agarosa (Seakem)	0.6 g
Sol. reguladora de barbital sódico, pH 8.6	50.0 ml
Agua deionizada	50.0 ml
Azida de sodio	100.0 mg

Por cada laminilla se colocaron 3 ml de agarosa fundida, se dejó solidificar 30 min y se guardaron en una cámara húmeda a 4°C, 18 horas.

En una cámara de electroforesis con solución reguladora de barbital sódico, pH 8.6, se realizó la CIE, en cada pozo se colocaron 8 μ l de las fracciones mitocondrial, se aplicaron 2 mA por laminilla y el indicador se dejó migrar 2.5 cm -- (azul de bromofenol-albúmina). Después se incubó a 37°C, 1 hora y a 20°C durante 48 horas, se lavó 5 días en SSB con 3 cambios, en agua destilada 2 horas, se secaron cubriendolas con papel filtro y dejandolas a 40°C 24 horas, posteriormente se tificaron con azul brillante de Coomassie y se contrastaron las

bandas con solución decolorante.

5. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se realizó de acuerdo a la técnica de Weber y Osborn (47).

1. Preparación de geles:

Fosfato de sodio 0.2 M con dodecíl-sulfato de sodio- (SDS) al 0.2%	12.5 ml
Acrilamida al 40%	4.69 ml
Bisacrilamida al 2%	2.54 ml
Persulfato de amonio 5 mg/ml	1.25 ml
Tetrametiletilendiamino (TEMED)	0.02 ml

Se agregaron los reactivos en forma sucesiva y con agitación constante e inmediatamente se llenaron los tubos de vidrio con una pipeta Pasteur, luego se cubrieron con agua destilada para favorecer la polimerización, se dejaron 60 min. a 20°C y se mantuvieron a 20°C hasta el momento de usarlos.

2. Procesamiento de las muestras:

Sol. A:

Fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0	80.0 ml
Dodecíl-sulfato de sodio	10.0 ml
Beta-mercaptoetanol	10.0 ml

Sol. B:

Fosfato de sodio 0.2 M-SDS al 0.2%	5.0 ml
------------------------------------	--------

Beta-mercaptoetanol	0.5 ml
Azul de bromofenol	5.0 mg
Glicerina	5.0 ml

A 180 μ l de FMC, FMP-ligera y FMP-pesada se les --
agregó 20 μ l de solución A a cada fracción y se incubaron a
56°C , 30 min, después se les añadió 140 μ l de solución B, -
se agitaron y se dejaron a 4°C por 18 horas.

3. Electroforesis:

Se extrajo el agua colocada sobre los geles de poliacrilamida, se agregaron 50 y 100 μ l de las muestras preparadas. Se realizó la electroforesis en una cámara y se utilizó - solución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, se aplicaron 4 mA por cada tubo hasta pasar la interfase del gel, posteriormente se aumentó a 8 mA.

Al finalizar la electroforesis se extrajo el gel del tubo, se midió el frente del colorante, se tiñó con azul brillante de Coomassie durante 90 min y se contrastaron las bandas con solución decolorante (ácido acético-5 ml, metanol-5 ml y agua destilada 90 ml).

6. Estudio de la reacción cruzada entre los antígenos mitocondriales del corazón, hígado y músculo esquelético de diversas especies animales.

Se obtuvo la FMP-ligera y FMP-pesada del corazón, --- hígado y músculo esquelético, tal como se señaló anteriormente de las siguientes especies animales:

Perro - Canis familiaris.

Rata - Rattus norvegicus. (Wistar).

Gallo - Gallus domesticus, (White Leghorn).

La concentración de proteína total de cada uno de los lotes de mitocondrias fue determinada por el método de Lowry.

Los antígenos mitocondriales de cada uno de los tejidos de las especies mencionadas se probaron por MDI en placas de agar al 1.5%. En los pozos periféricos se depositaron 50 μ l de la FMP-ligera (1.3 mg/ml), de la FMP-pesada (0.3 mg/ml) y - en los pozos centrales se colocaron 50 μ l de suero de conejo a-FMC o a-FMP, realizandose varias combinados de antígeno y de anticuerpos, para observar las reacciones cruzadas, bandas de - identidad, identidad parcial y no identidad.

7. Estudio de anticuerpos contra mitocondrias en pacientes con una enfermedad cardiovascular y en sujetos normales.

Se analizaron sueros de pacientes con enfermedad car-

diovascular y de sujetos normales, mediante los métodos inmunológicos de MDI y CIE, contra mitocondrias (FMC), como ya se señaló anteriormente, para lo cual las mitocondrias se sonicaron previamente, durante 1 min, cada 15 segundos a 4°C (sonicador Labsonic 1510) y se utilizaron a una concentración de 1 mg/ml.

Los grupos de pacientes estudiados fueron los siguientes:

<u>Grupo</u>	<u>Núm.</u>
1. Fiebre reumática activa	75
2. Fiebre reumática inactiva	284
3. Infarto e isquemia del miocardio	72
4. Cardiopatías congénitas	83
5. Enfermedades no cardíacas	102
6. Donadores de sangre	150
7. Estudiantes de la UNAM	180
Total	946

8. Efecto de los anticuerpos antimitocondria, sobre la función y estructura de las mitocondrias cardíacas.

A. Efecto de los anticuerpos sobre la función de las mitocondrias.

Para realizar los ensayos, se obtuvo la FMC y se determinó la concentración de proteína mitocondrial, inmediata-

mente después se midió la actividad respiratoria de las mitocondrias polarográficamente con un electrodo de oxígeno de Clark, en 3 ml de medio saturado de oxígeno (SMG-Pi):

Malato 0.1 M, pH 7.3	0.3 ml
Glutamato 0.1 M, pH 7.3	0.1 ml
Cloruro de potasio 3 M	0.125 ml
Fósforo inorgánico 0.1 M, pH 7.3	0.2 ml
Agua bidestilada	2.275 ml

El oxímetro se ajustó a 0. y 100% de saturación de oxígeno con SMG-Pi.

Se observó el "acoplamiento mitocondrial" de las mitocondrias de corazón de perro obtenidas en la FMC, para lo cual se midió el consumo de oxígeno de 2 mg de proteína mitocondrial, mediante la adición de 10 μ l de adenosín-difosfato (ADP) con una concentración de 20 mg/ml, cada vez que se consumía un 15% de oxígeno presente en el medio utilizado, para estimular el consumo de oxígeno.

Este ensayo control fue realizado al iniciar y terminar cada experimento.

Se realizó el siguiente ensayo con gammaglobulinas:

Mitocondrias + a-FMC ó a-FMP, y/o complemento.

Utilizándose como controles:

- a) Mitocondrias.
- b) Mitocondrias + gammaglobulina de conejo normal.
- c) Mitocondrias + complemento.

Algunos ensayos se realizaron incubando previamente a diferentes temperaturas (24 y 37°C).

El suero de cuyo (Cavia porcellus) se uso como fuente de complemento.

B. Efecto de los anticuerpos sobre la estructura de las mitocondrias.

Para observar el efecto de los anticuerpos antimitocondrias sobre las mitocondrias fue medido el "hinchamiento mitocondrial" por registro del decremento en la densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro PMQ 3 (C. Zeiss).

En cada experimento se utilizaron 50 μ l de mitocondrias (2 mg de proteína), los ensayos se realizaron con solución amortiguadora (SSTE) de la siguiente manera:

Mitocondrias + a-FMP (gammaglobulina).

Usandose como controles:

- a) Mitocondrias.
- b) Mitocondrias + gammaglobulina de conejo.

Los anticuerpos se adicionaron lentamente a las cubetas que contenían las mitocondrias disueltas en SSTE, se agitó

y aproximadamente a los 5 min se leyó la densidad óptica.

V RESULTADOS.

Obtención de mitocondrias.

En comparación con las mitocondrias obtenidas por homogeneización en licuadora, con lo que se obtuvieron membranas mitocondriales con pérdida de las crestas y la matriz mitocondrial como se puede observar en la microfotografía al microscopio electrónico en la figura 1A, las mitocondrias extraídas con arena, presentaron menor daño, por lo que se decidió utilizar éste último método, ya que se obtuvieron mejor conservadas y completas, pero también presentaron contaminantes subcelulares como sarcolema y lisosomas (fig. 1B). Para tratar de eliminar los contaminantes, las mitocondrias obtenidas con arena -- (FMC) se pasaron a través de un gradiente discontinuo de sacarosa (FMP), las que obtuvieron completas, con poco daño estructural y solo se observó una discreta contaminación por algunas fracciones subcelulares como los lisosomas (fig. 1C).

Con el gradiente discontinuo de sacarosa para la obtención de mitocondrias puras (FMP) se obtuvieron 2 fracciones (fig. 2):

FMP-ligera.- que se localizó entre las capas del 40 y 50% de sacarosa y que consistía de mitocondrias de menor peso molecular.

FMP-posada.- Que se obtuvo en el botón formado en el fondo del tubo, conteniendo mitocondrias de mayor peso molecu-

lar.

Rendimiento de proteínas.

En la tabla 1 se indican los resultados de peso húmedo de corazón obtenidos en cada extracción de las FMC y la concentración de proteína; no se encontró relación alguna entre éstos parámetros en 10 corazones; se obtuvo en promedio 72.9 g de peso y 11.8 mg/ml de proteína, en los corazones número 4 y 10 el peso húmedo es muy distinto y la concentración de proteína total es igual.

Tampoco se encontró relación entre el peso del corazón y la concentración de proteína en las fracciones mitocondriales puras (ligera y pesada), el promedio de peso fue de 76.6 g y la concentración de 5.1 mg/ml de mitocondrias ligeras y 2.0 mg/ml de mitocondrias pesadas. La concentración de mitocondrias ligeras es mayor que las mitocondrias pesadas, como se observa en la tabla 2.

El rendimiento de proteínas mitocondriales (FMP) de -- diversos organismos, extraída por el mismo método es mayor en -- el perro tomando en cuenta la fracción ligera y pesada y los -- diferentes tejidos, ya que se obtuvo un promedio de 3.8, luego en la rata con 2.6 y en el gallo 1.9 mg/ml.

Comparando en los tres tejidos diferentes la concen -- tración de proteínas de las tres especies, se encuentra que en --

el corazón se tiene más proteína, en especial en la fracción -
ligera, posteriormente en el hígado en la fracción pesada y fi
nalmente en el músculo, tabla 3.



Figura 1. Microfotografías obtenidas con microscopio electrónico.

1A. Mitochondrias extraídas por licuadora y homogeneizador.

1B. Mitochondria extraídas con arena y purificadas en gra-
diente discontinuo de sacarosa.

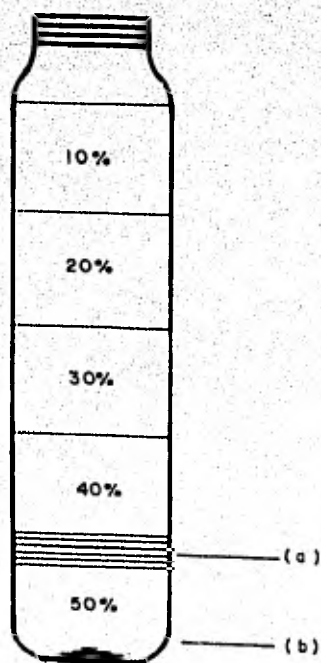


Figura 2 Separacion de mitocondrias cardiacas
en un gradiente de sacarosa (10 o 50%)

(a) FMP - ligera

(b) FMP - pesada

Tabla 1. Peso del tejido cardiaco y concentración de proteína mitocondrial en la FMC.

Corazón	Peso (g)	Proteína (mg/ml)	Prot. Total (mg)
1	54.6	4.3	25.8
2	90.6	18.8	114.8
3	109.0	6.4	38.4
4	73.0	16.2	73.2
5	87.5	4.3	25.8
6	59.7	16.8	100.8
7	49.0	6.0	36.0
8	83.0	15.0	90.0
9	93.0	15.0	90.0
10	29.9	16.0	96.0
Promedio	72.9	11.8	69.0
Desv. Estand	22.94	5.53	32.39
Coef. de correlación (r)		-0.03	

Tabla 2. peso del tejido cardiaco y concentración de proteína mitocondrial en la FMP.

Corazón	Peso (g)	FMP-ligera (mg/ml)	FMP-pesada (mg/ml)
1	49.4	0.7	-
2	69.9	6.5	-
3	119.8	12.8	-
4	126.5	3.2	-
5	98.5	6.4	-
6	55.0	2.9	-
7	74.5	2.8	-
8	123.0	3.2	-
9	95.0	5.0	2.9
10	140.0	4.8	3.0
11	62.5	2.5	2.3
12	76.5	3.7	1.6
13	23.0	1.5	1.3
14	45.0	2.6	1.4
15	64.0	0.9	0.5
16	45.5	8.7	4.4
17	55.0	6.8	1.9
18	56.5	9.5	1.1
Promedio	76.6	5.1	2.0
Desv. Estand.	32.20	3.11	1.08
Coef. de correlación (r)		0.12	0.30

Tabla 3. Concentración de proteína en mg/ml de las fracciones mitocondriales puras de diversas especies y tejidos.

FMP	Perro	Rata	Gallo	Prom.
Pesada de Cor.	1.9	6.9	1.3	3.4
Ligera de Cor.	4.4	3.7	8.5	5.5
Pesada de Híg.	9.6	0.5	1.2	3.8
Ligera de Híg.	2.0	1.6	0.2	1.3
Pesada de Mús.	0.4	2.2	0.4	1.0
Ligera de Mús.	4.2	0.9	0.0	1.7
Promedio	3.8	2.6	1.9	2.8
Desv. Estand.	2.9	2.1	2.9	1.6

Obtención de anticuerpos.

Por MDI los antisueros antimitocondrias al reaccionar con mitocondrias presentaron una ligera variación en la respuesta inmune con respecto a cada conejo y al tiempo. Como se observa en la tabla 4, hay variación de respuesta entre los diversos conejos, ya que en los conejos inmunizados con FMC, el conejo 253, presenta mayor respuesta, dando en promedio 4 bandas y el conejo 255 dá solo 1.7 bandas.

Con respecto al tiempo de inmunización, la variación es ligera, pero se observa un aumento de la respuesta humoral en el cuarto sangrado.

En los conejos inmunizados con FMP, también hay variación en la respuesta de conejo a conejo y con respecto al tiempo. El conejo 291 dió mejor respuesta, ya que formó 5 bandas en promedio, siendo en el cuarto sangrado cuando se obtuvo mayor número de bandas, los conejos 293 y 294 presentaron menor número de bandas. Se obtuvieron hasta 5 sistemas antígeno-anticuerpo con la FMC contra a-FMC por MDI; y con la FMP contra a-FMP se presentaron 6 bandas de precipitación como máximo.

Tabla 4. Niveles de anticuerpos contra antígenos mitocondria -
les en conejos durante 116 días valorados por MDI.

Antisuero	1er. Sang.	2o. Sang.	3o. Sang.	4o. Sang.	Promedio
252	3 ^A	2	4	2	2.7
253	5	4	2	5	4.0
255	1	2	2	2	1.7
Promedio	3.0	2.6	2.6	3.0	2.8
291	6	6	3	5	5.0
293	2	3	3	4	3.0
294	3	2	2	3	2.5
Promedio	3.6	3.6	2.6	4.0	3.5

a = Número de sistemas antígeno-anticuerpo.

252, 253 y 255 = antisueros a-FMC.

291, 293 y 294 = antisueros a-FMP.

Caracterización de antígenos.

Optimización del extracto antigénico.

Con el propósito de obtener mayor número de antígenos se solubilizaron los antígenos mitocondriales con tritón X-100 y urea (T-X-U), cuyo efecto muestra una disminución en el número de bandas, en general la FMC-solubilizada presenta una disminución promedio de 0.9 tanto en la FMC entera como en la diluida en 1:2, el probarse en 3 diferentes sangrados de antisue - - - ros antimitocondriales (a-FMC), tabla 5. También se observa -- que en las placas con agar sin T-X-U, el promedio del número -- de sistemas antígeno-anticuerpo es mayor que en las placas con agar-T-X-U (promedio de 2.4 vs 1.8), excepto en el primer sangrado del conejo 255.

La tabla 6 muestra un efecto semejante del T-X-U en - el agar sobre el ASCP y el SP, ya que resulta disminuído el -- promedio de bandas; pero con los antígenos como el ASCH aumenta ligeramente el promedio de 0.8 a 1.0.

La fig. 3A y 3B muestran las diferencias en el núme - ro de bandas obtenidas de 2 sueros diferentes (291 y 294) al - enfrentarse con la FMC y la FMC-solubilizada a diferentes con - centraciones; como se observa las fracciones solubilizadas --- presentan menor número de bandas.

En la fig. 3C y 3D se presentan las reacciones antí -

geno-anticuerpo de los anticuerpos antimitocondriales con antígenos humanos y antígenos de perro diferentes a las mitocondrias; con ASCH dió 1 y 2 bandas, con Suero Humano ninguna, -- con ASCP de 2 a 5 y con SP 1 banda. El SP vs ASCH presentó 2 -- bandas de precipitación.

Pruebas de precipitación.

Con el fin de analizar las bandas de precipitación -- se usó la IEF (tabla 7), en que se presentan los datos obtenidos con los anticuerpos antimitocondriales, donde se obtuvo -- desde 1 banda con la FMP-pesada hasta 5 con la FMC. No hubo -- diferencias significativas en el número de bandas entre mitocondrias sonicadas y sin sonicar (promedio de 4.0 en ambas). -- Las fracciones mitocondriales de corazón purificadas en gradientes de sacarosa dieron menor número de sistemas antígeno -- anticuerpo; la fracción ligera 3 bandas (promedio de 2.8) y -- la fracción pesada 1 banda (promedio de 1.5).

La tabla 8 también muestra los resultados de la IEF -- de la mezcla a-FMC y a-FMP con diferentes fracciones mitocondriales de perro, el promedio de bandas en ambas mezclas es pa -- recido (2.3 y 2.6), siendo mayor el número de bandas con la -- FMP-pesada del hígado (7 y 9 bandas) y menor con la FMP-pesada del corazón (1 bandas), con la FMP del músculo no se presentan

bandas.

En la fig. 4 se presentan los patrones inmunolectroforéticos de las fracciones mitocondriales: la FMC dió 5 bandas de precipitación, 4 isoelectricas y 1 anódica; la FMP-ligera presentó 3 bandas de las cuales 2 son isoelectricas y 1 anódica y la FMP-pesada dió 1 banda isoelectrica.

La técnica de CIE también se empleó para analizar las bandas de precipitación, se obtuvieron desde 1 hasta 7 bandas y en promedio el número de bandas es semejante entre la FMC, FMC-sonicada y FMP-ligera, siendo menor en la FMP-pesada, (tabla 9). En la fig. 5 se observan 5 sistemas antígeno-anticuerpo de a-FMC enfrentados a la FMC.

Al realizarse la CIE de las fracciones mitocondriales puras del corazón, hígado y músculo del perro, de la rata y del gallo contra la mezcla de a-FMC y a-FMP; se encontró que la mezcla a-FMP responde mejor a los antígenos (promedio de 2.0 vs 1.2). En general los antígenos mitocondriales del perro presentaron mayor número de bandas, ya que el corazón e hígado dieron 4 bandas y el músculo 3; en la rata el corazón e hígado dieron 3 bandas y el músculo 1; y en el gallo unicamente con el músculo se obtuvo 1 banda, tabla 10.

Tabla 5. Efecto del tritón X-100 y urea, sobre el número de bandas en MDI formados con la FMC y el suero específico.

Sang.	Conejo #	Placas	FMC		FMC-solubilizada		Promedio
			E	1:2	E	1:2	
1o.	252	T-X-U	3	3	2	2	2.5
		- - -	4	4	2	2	3.0
	253	T-X-U	4	4	4	3	3.8
		- - -	4	4	5	4	4.2
	255	T-X-U	2	2	0	1	1.2
		- - -	1	1	1	1	1.0
2o.	252	T-X-U	1	1	1	0	0.8
		- - -	1	1	1	1	1.0
	253	T-X-U	4	2	2	2	2.5
		- - -	4	4	4	3	3.8
	255	T-X-U	0	0	0	0	0.0
		- - -	1	1	1	1	1.0
3o.	252	T-X-U	4	4	3	2	3.2
		- - -	5	3	3	3	3.5
	253	T-X-U	1	1	1	1	1.0
		- - -	1	2	1	1	1.2
	255	T-X-U	2	2	1	0	1.2
		- - -	4	3	2	1	2.5
Promedio	T-X-U	2.3	2.1	1.5	1.2	1.8	
	- - -	2.8	2.5	2.2	1.8	2.4	

T-X-U = Placas de agar disuelto en tritón X-100 y urea.

- - - = Placas de agar disuelto en SSB.

Tabla 6. Efecto del tritón X-100 y urea en el agar sobre el ASCP, SP, ASCH y SH por MDI.

Sang.	Conejo	ASCP		SP		ASCH		SH	
		- -	T-X-U	- -	T-X-U	- -	T-X-U	- -	T-X-U
1o.	252 ^b	5 ^a	5	1	1	1	1	0	0
	253	5	6	2	1	1	1	1	1
	255	2	2	1	1	1	2	0	0
2o.	252	2	1	1	1	1	0	2	1
	253	5	3	2	1	1	1	1	0
	255	2	1	1	1	1	1	0	0
3o.	252	5	3	4	3	1	1	0	1
	253	2	2	2	1	0	1	1	1
	255	2	1	3	2	0	1	1	1
Prom.		3.3	2.6	1.8	1.3	0.8	1.0	0.6	0.6

a = Número de sistemas antígeno-anticuerpo.

b = Conejos inmunizados con FMC.

T-X-U = Placas de agar disuelto en tritón X-100 y urea.

- - - = Placas de agar disuelto en SSB.

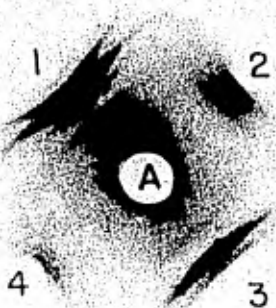


Figura 3A. Microinmunodifusión de anticuerpos antimitocóndrias curas del sacro de conejo 291 (A); frente a -- PMC: 590 μ g de proteína (1), 295 μ g *3) y frente a -- PMC - solubilizada con tritón X-100 y urea; 295 μ g (2) y 147 μ g (4).

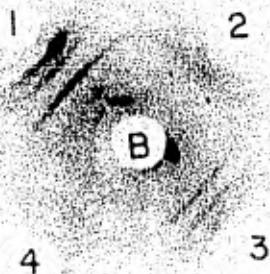


Fig. 3B. Microdoubleimmunodifusión de anticuerpos antimitocondrias puras del suero de conejo 294 (B) frente a -- PNC: 590 ug de proteína (1), 295 ug (3) y frente a - PNC-solubilizada con tritón X-100 y urea: 295 ug (2) y 147 ug (4).

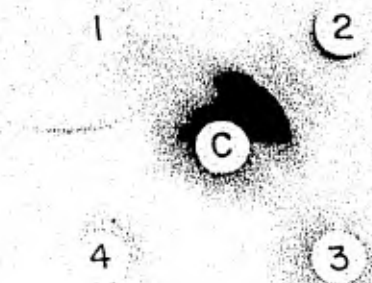


Figura 3C. Microdoble inmunodifusión de anticuerpos antimitocondrias puras de suero del conejo 291 (C) enfrentados a: antígeno soluble de corazón humano (1), antígeno soluble de corazón de perro (2), suero humano (3) -- y suero de perro (4).

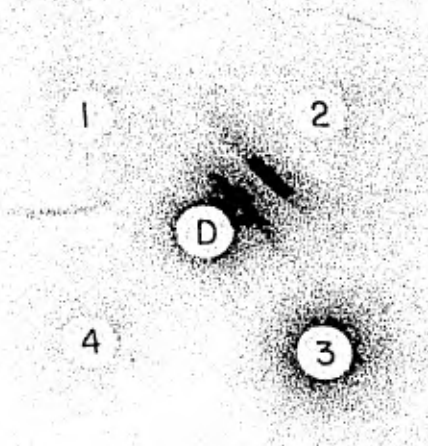


Figura 10. Microinmuno-difusión de anticuerpos antimitocondria para el suero del conejo 294 (D) enfrentados a: antígeno soluble de corazón humano (1), antígeno soluble de corazón de perro (2), suero humano (3) y suero de perro (4).

Tabla 7. Inmunoelectroforesis de gammaglobulina antimitocondrial contra fracciones mitocondriales de corazón de perro.

Conejo	FMC	FMC Sonicada	FMP Ligera	FMP Pesada	Prom.
253 ^b	3 ^a	4	2	2	2.8
255 ^b	5	5	3	2	4.0
291 ^c	4	3	3	1	2.8
294 ^c	4	4	3	1	3.0
Promedio	4.0	4.0	2.8	1.5	3.2

a= Número de sistemas antígeno-anticuerpo.

b= Antisueros a-FMC.

c= Antisueros a-FMP.

Tabla 8. Inmunolectroforesis de antisueros antimitocondriales con fracciones mitocondriales de corazón, hígado y músculo de perro (FMP).

FMP de perro	Mezcla de a-FMC	Mezcla de a-FMP	Promedio (Bandas)
Ligera de Cor.	3,4 ^a	4,5	4,0
Pesada de Cor.	0,0	1,0	0,2
Ligera de Híg.	3,5	3,4	3,8
Pesada de Híg.	6,7	9,5	6,8
Ligera de Mús.	0,0	0,0	0,0
Pesada de Mús.	0,0	0,0	0,0
Promedio	2,3	2,6	

a= Número de sistemas antígeno-anticuerpo.

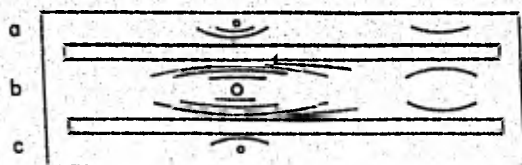


Figura 4. Representación esquemática de los patrones inmunoelectroforéticos de:

- a. F M P - ligera
- b. F M C
- c. F M P - pesada

Tabla 9. Contraelectroforesis de fracciones de corazón de perro contra anticuerpos antimitocondrias.

Fracción mitoc.	253 ^a	255 ⁿ	291 ^b	294 ^b	Promedio
FMC	3	3	3,2	4,5	3.3
FMC-sonicada	4	4	2	4	3.5
FMP-ligera cor.	7,3	5,1	3,2	2,2	3.1
FMP-pesada cor.	3,1	6,2	3,3	1,1	2.5
Promedio	3.5	3.2	2.6	2.7	

a= Antisueros a-FMC.

b= Antisueros a-FMP.

Tabla 10. Contraimmunoelectroforesis de antisueros antimitocondriales contra fracciones mitocondriales puras de diversos tejidos de perro, rata y gallo.

Tojido	Especie	Mezcla de a-FMC	Mezcla de a-FMP	Promedio
Corazón	Perro	2 ^a	4	3.0
	Rata	3	2	2.5
	Gallo	0	0	0.0
Hígado	Perro	1	4	2.5
	Rata	2	3	2.5
	Gallo	1	1	1.0
Músculo	Perro	1	3	2.0
	Rata	1	1	1.0
	Gallo	0	0	0.0
	Prom.	1.2	2.0	

a= Número de sistemas antígeno-anticuerpo.



Figura 5. Contraelectroforesis de mitocondrias crudas -
(A y C) contra diversas mezclas de anticuerpos anti
mitocondriales (B y D), donde se observan hasta 5 -
sistemas antígeno-anticuerpo.

Electroforesis.

Con el propósito de analizar cuantos componentes proteicos tenían las fracciones mitocondriales de corazón de perro, se hicieron electroforesis en gel de poliacrilimida; en la FMC se observaron 19 bandas de proteína. En la fig. 6A se muestra la separación de 50 y 100 μ l de la FMP, se observan 23 y 20 bandas respectivamente. La fig. 6B muestra la separación de la FMP-ligera y de la FMP-pesada de mitocondrias de corazón de perro, en la primera se obtuvieron 20 bandas y en la segunda 30 bandas.

Las mitocondrias de hígado de perro presentaron 17 -- bandas distinguibles en la FMP-ligera y 22 en la FMP-pesada, -- con el músculo se obtuvo un menor número de bandas, 16 en la FMP-- ligera y 4 en la FMP-pesada.

Reacciones cruzadas (MDI).

Los anticuerpos antimitocondrias de corazón de perro dan reacción cruzada con las mitocondrias del corazón, hígado y músculo de las diferentes especies analizadas, que son el pe rro, la rata y el gallo, aunque no en el mismo grado (tabla -- 11), estos reaccionan más con los antígenos mitocondriales del perro (corazón, hígado, y músculo) con un promedio de bandas -- de 2.6, dando hasta 5 sistemas antígeno-anticuerpo con el co -- razón y con el hígado y 4 con el músculo. Estos anticuerpos --

también reaccionan con las fracciones mitocondriales de la rata con un promedio de 0.6, con 2 bandas como máximo con el corazón, hígado y músculo, el promedio de reacción entre estos 3 fue muy semejante.

Con los antígenos mitocondriales del gallo los anticuerpos también dan reacción cruzada con promedio total de bandas de 0.3, siendo mayor la respuesta con el hígado y luego con el corazón, dando 2 y 1 bandas respectivamente, con el músculo no hubo reacción.

Los antisueros a-FMP dan en promedio más número de bandas (1.3) que los a-FMC (0.9). Las fracciones ligeras presentan en promedio mayor número de bandas (1.4), que las fracciones pesadas (0.9).

Con el fin de eliminar diferencias individuales se mezclaron los sueros de los conejos 252, 253 y 255 (a-FMC) y de los conejos 291, 293 y 294 (a-FMP). En la tabla 12 también se muestran las reacciones cruzadas del corazón, hígado y músculo de las diversas especies frente a los antisueros agrupados; con la mezcla a-FMC el promedio de bandas fue de 1.0 y con la mezcla a-FMP de 1.4, como se observa los antisueros y anticuerpos a-FMP dan mayor número de bandas con sus correspondientes antígenos inmunizantes (FMP).

Al encontrar que los antígenos mitocondriales de las-

diversas especies daban reacción cruzada al probarse con anticuerpos antimitocondriales de corazón de perro, se hizo un análisis del tipo de reacción cruzada que presentaban éstos anticuerpos contra los antígenos mitocondriales de los diferentes tejidos del perro, de la rata y del gallo.

Los antígenos mitocondriales de corazón de perro presentaron con los antígenos mitocondriales de hígado de perro - reacción de identidad (1 y 2 bandas), de identidad parcial (1) y de no identidad (1); con los antígenos mitocondriales de -- músculo de perro, reacción de identidad (1 y 2) e identidad-parcial (1 y 2 bandas).

Como se observa en la tabla 13, el corazón del perro-con el corazón de la rata dan bandas de identidad (1 y 2), -- identidad parcial (1) y no identidad (1); el hígado del perro-y el hígado de la rata dan identidad (1 y 2 bandas), no identi-dad (1 y 2); el músculo de perro con el músculo de rata solo - dan bandas de identidad (1 y 2).

El corazón de perro con el corazón de gallo dan iden-tidad parcial (1); el hígado de perro con el hígado de gallo - presentaron identidad (1) e identidad parcial (1); el músculo-de perro con el músculo de gallo no dan ninguna reacción.



Figura 6A. Electroforesis en gel de acrilamida con S.D.S., de la PVP de corazón de perro empleando 50 μ l (1) y 100 μ l (2).



Figura 6B. Electroforesis en gel de acrilamida con S.D.S., de la FMP de corazón de perro empleando PMP-ligera (1) y PMP-pesada (2).

Tabla 11. Reacciones cruzadas entre las FMP de diversos tejidos de perro, rata y gallo con diversas gammaglobulinas de conejo antimitocondriales en MDI.

Tej. Especie	253 ^b		255 ^b		291 ^c		293 ^c		294 ^c		Prom.
	L.	P.	L.	P.	L.	P.	L.	P.	L.	P.	
Cor. Perro	2 ^a	1	3	2	5	2	2	0	5	1	2.3
Rata	0	0	1	1	2	1	0	0	2	0	0.7
Gallo	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0.3
Hfg. Perro	2	4	4	3	4	4	3	2	5	5	3.6
Rata	0	0	1	1	2	1	0	0	2	0	0.7
Gallo	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0.3
Músc. Perro	0	0	3	3	4	3	1	0	2	3	1.9
Rata	0	0	1	1	2	1	0	0	1	0	0.6
Gallo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Prom.	0.4	0.6	1.4	1.2	2.1	1.6	0.8	0.2	2.2	1.0	

a = Número de sistemas antígeno-anticuerpo.

b = Antisueros a-FMC.

c = Antisueros a-PMP.

L. = FMP-ligera.

P. = FMP-pesada.

Tabla 12. Reacciones cruzadas entre diferentes fracciones mitocondriales con diversas mezclas de antisueros por MDI.

Tejido	Especie	Mezcla a-FMC		Mezcla a-FMP		Promedio
		Liq.	Pes.	Liq.	Pes.	
Corazón	Perro	3 ^a	0	1	6	2.5
	Rata	1	0	0	2	0.8
	Gallo	1	0	0	0	0.2
Hígado	Perro	7	4	6	5	5.5
	Rata	1	0	0	1	0.5
	Gallo	0	1	0	0	0.2
Músculo	Perro	1	-	3	-	2.0
	Rata	0	-	1	-	0.5
	Gallo	0	-	0	-	0.0
	Prom.	1.6	0.8	1.2	2.3	

a = Número de sistemas antígeno-anticuerpo

Tabla 13. Reacciones cruzadas entre antígenos mitocondriales del perro con rata y gallo por MDI.

Especie	Tejido		Corazón	Hígado	Músculo
Rata	Corazón	I	1,2	0	0
		IP	1	0	0
		No I	1	0	0
	Hígado	I	0	1,2	0
		No I	0	1,2	0
	Músculo	I	0	0	1,2
Gallo	Corazón	IP	1	0	0
	Hígado	I	0	1	0
		IP	0	1	0

I = Reacción de identidad.

IP = Reacción de identidad parcial.

No I = Reacción de no identidad.

Anticuerpos contra mitocondrias en sueros humanos.

Con el fin de encontrar la frecuencia de los anticuerpos contra mitocondrias, se estudió una población de sueros -- de sujetos con diversas enfermedades del corazón, enfermedades no cardiacas e individuos aparentemente normales, donadores de sangre (que eran familiares de los enfermos) y estudiantes de la Universidad; de ambos sexos, con una proporción más o menos igual de hombres y mujeres, excepto en los donadores de sangre, en los que se tuvo una mayor proporción de hombres; -- con edades promedio variables (tabla 14).

La tabla 15 muestra el porcentaje de positividad de los sueros contra los antígenos mitocondriales (FMC) por MDI y CIE, como se observa la CIE detecta mayor porcentaje de anticuerpos antimitocondriales que la MDI, también se analizó el número de bandas de precipitación siendo este muy semejante en ambas pruebas (tabla 16).

Tabla 14. Características de la población estudiada.

Individuos	No. de sueros	Sexo (%)		Edad (Promedio)
		F	M	
Fiebre reumática activa	75	53	47	17 [±] 6
Fiebre reumática inactiva	284	58	42	30 [±] 3
Isquemia e infarto del miocardio	72	40	60	57 [±] 14
Cardiopatías congénitas	83	52	48	16 [±] 12
Enfermedades no cardíacas	102	51	49	38 [±] 17
Donadores de sangre normales	150	17	83	27 [±] 7
Estudiantes universitarios	180	52	48	16 [±] 5
Total	946	323	377	

Tabla 15. Porcentaje de positividad de sueros humanos probados
contra antígenos mitocondriales (FMC) por CIE y MDI.

Sueros	CIE	MDI
Fiebre reumática activa	35	3
Fiebre reumática inactiva	31	2
Isquemia e infarto del miocardio	28	1
Cardiopatías congénitas	36	1
Enfermedades no cardíacas	30	1
Donadores de sangre normales	24	3
Estudiantes universitarios	18	2

Tabla 16. Promedio del número de bandas formadas por CIE y -
MDI, en los diferentes grupos de sueros positivos.

Sueros	CIE	MDI
Fiebre reumática activa	1.1	1.3
Fiebre reumática inactiva	1.1	1.0
Isquemia e infarto del miocardio	1.0	1.0
Cardiopatías congénitas	1.1	1.0
Enfermedades no cardíacas	1.2	1.0
Donadores de sangre normales	1.0	1.0
Estudiantes universitarios	1.0	1.0

Efecto de los anticuerpos sobre las mitocondrias.

En la tabla 17 se muestran los resultados del análisis del efecto de los anticuerpos antimitocondria sobre el control-respiratorio mitocondrial, como se observa hay una disminución del consumo de oxígeno por las mitocondrias cuando se añaden los anticuerpos (experimento 2 y 3). El estado 4 no se modificó. En el estado 3 fue menor el consumo de oxígeno al aumentar la cantidad de anticuerpos y la temperatura, 35°C y 20 min (exp. 4 y 5).

El porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno aumentó al adicionar las gammaglobulinas antimitocondriales y fue mayor al aumentar la cantidad de anticuerpos, la temperatura y el tiempo de incubación.

En la tabla 18 se muestra el efecto de los anticuerpos y el complemento sobre la función respiratoria mitocondrial. En el experimento 2 se agregaron directamente los anticuerpos a las mitocondrias y a la concentración empleada no se observó ninguna diferencia con respecto al control, pero cuando se incubaron a 37°C por 15 min. se obtuvo una inhibición del 61% (exp. 4). Al añadir anticuerpos más complemento e incubar a 37°C durante 15 min, la inhibición fue de un 90% (exp. 6). Por otro lado el complemento por sí solo inhibió hasta un 75% el consumo de oxígeno.

La gammaglobulina del conejo # 20, mostró inhibición-

al 36% (exp. 3) y hasta 93%, cuando se incubó a 37°C, 15 min.

En la fig. 7 se muestra el efecto de los anticuerpos antimitocondriales, sobre la respiración estimulada por ADP - en mitocondrias; como puede observarse el anticuerpo antimitocondria inhibe el estado 3 respiratorio, lo cual indica que - hay inhibición de la formación de ATP.

El efecto del anticuerpo sobre la estructura mitocondrial, se midió por el grado de "hinchamiento mitocondrial" y los resultados se muestran en la tabla 19. Los anticuerpos empleados (gammaglobulina antimitocondrial) modificaron en más de 0.2 unidades de densidad óptica la preparación de mitocondrias (FMC), lo que sugiere un cambio estructural en las mismas. La gammaglobulina del conejo # 20 también provocó una disminución semejante de unidades de densidad óptica.

Tabla 17. Efecto de los anticuerpos antimitocondria sobre el control respiratorio mitocondrial.

Exp.	Adiciones	$\text{nAO min}^{-1} \text{mg}^{-1}$		Control Respiratorio	Inhibición (%)
		Estado 4	Estado 3		
1	----	70 ^a	194	2.7	---
2	Ac. 291 ^b	72	153	2.1	21.2
3	Ac. 253 ^c	72	171	2.4	11.9
4	Ac. 291 ^d	72	138	1.9	29.9
5	Ac. 253 ^e	78	126	1.6	35.1

a= cifras que representan el promedio de 3 determinaciones.

b= 3 mg, incubación directa a 24°C.

c= 2.5 mg, incubación de 20 min a 35°C.

d= 4.0 mg, incubación directa a 24°C.

e = 3.4 mg, incubación de 20 min a 24°C.

Tabla 18. Efecto de los anticuerpos antimitocondria sobre el control respiratorio mitocondrial.

Exp.	Adiciones	$\text{NA } 0 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$		Control Respiratorio	Inhibición (%)
		Estado 4	Estado 3		
1	----	05 ^a	165	1.9	---
2	Ac. 253 ^b	87	168	1.9	---
3	Ac. 20 ^c	96	138	1.5	36.0
4	Ac. 253 ^d	66	63	0.0	61.0
5	Complemento ^e	18	42	2.3	75.0
6	253 + Compl. ^f	12	18	1.5	90.0
7	Ac. 20 ^g	6	12	2.0	93.0

a = promedio de 3 determinaciones.

b = 1.6 mg e incubación directa a 24°C.

c = 1.8 mg e incubación directa a 24°C.

d = 1.6 mg e incubación de 15 min a 37°C.

e = 30 μl e incubación de 15 min a 37°C.

f = 1.6 mg de Ac. + 30 μl de complemento e incubación de 15 min, 37°C

g = 1.8 mg e incubación de 15 min a 37°C.

Ac 20 = anticuerpos de conejo normal.

Tabla 19. Efecto de los anticuerpos antimitocondria sobre la estructura de las mitocondrias.

Exp.	Adiciones	D.O. (650nm)
1	-----	0.991
2	Ac. 291 ^a	0.761
3	Ac. 20 ^b	0.715
4	-----	0.946
5	Ac. 291 ^c	0.629
6	Ac. 20 ^d	0.626

D.O. = Densidad óptica a 650 nanómetros.

a = 0.6 mg.

b = 0.5 mg.

c = 1.0 mg.

d = 0.9 mg.

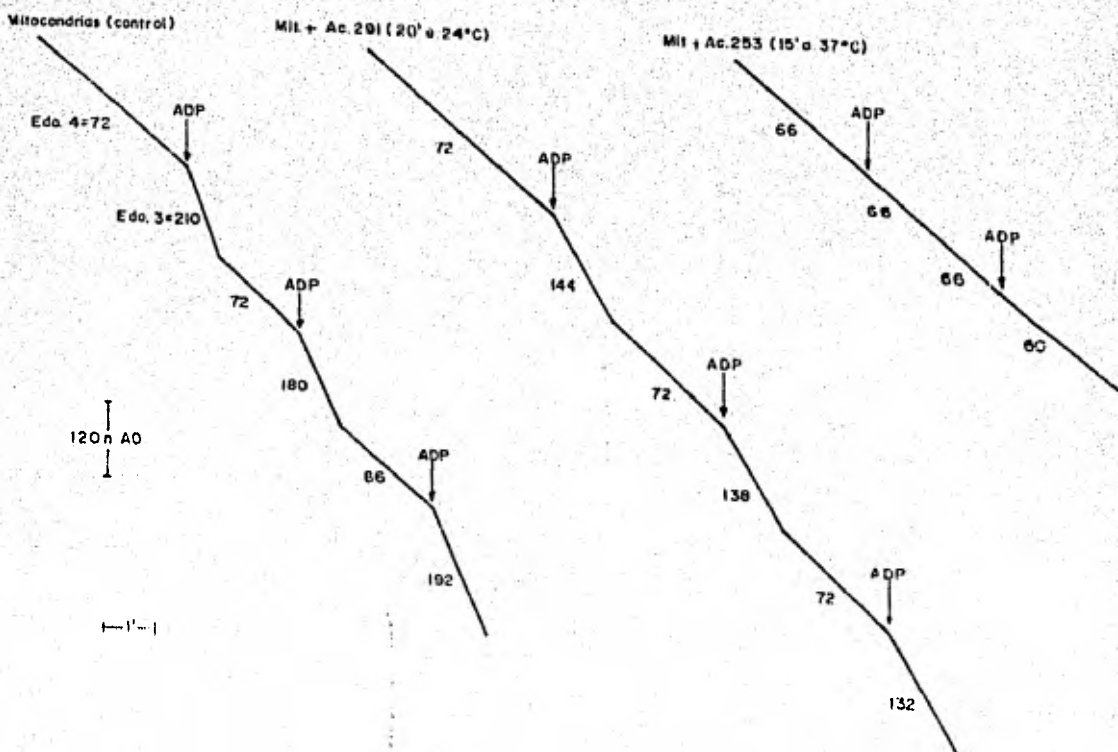


Figura 7. Trazos del electrodo de calgeno que ilustran el efecto del anticuerpo antimitocondria, sobre el control respiratorio de mitocondrias de corazón. Se mide la cantidad de nanomoles de oxígeno consumido.

VI DISCUSSION

La síntesis de autoanticuerpos contra varios componentes tisulares después de la necrosis celular parece ser un proceso fisiológico normal (33, 34).

En las enfermedades cardiovasculares frecuentemente se encuentra destrucción de las miofibrillas cardíacas (9, 26, 33, 34) por tal razón, parte de éste trabajo trató de caracterizar el antígeno(s) mitocondrial cardíaco más relevante para los enfermos cardiopatas, especialmente en aquellos con fiebre reumática, infarto del miocardio y sujetos con cardiopatías -- congénitas (25, 26, 33, 34).

Puesto que algunos antígenos mitocondriales son comunes a varios tejidos y especies, (1, 6, 14, 16, 17, 27, 28, -- 34, 39) se emplearon fundamentalmente mitocondrias de corazón de perro; aunque lo ideal es el uso de antígenos homólogos, es decir de corazón humano, pero las condiciones en que se requiere hacer la separación de mitocondrias exige el uso de tejido "fresco", requisito que no es fácil de llenar en el humano.

Existen varias metodologías para la obtención de mitocondrias (7, 11, 12, 13, 14, 18, 20, 25, 27), pero se decidió utilizar la de Cleland and Slater (11), pues ésta permite obtener los organelos en condiciones bioquímicas adecuadas. -- Además se logró separar la fracción mitocondrial con un grado aceptable de pureza, en un gradiente discontinuo de sacarosa --

(fracción ligera y pesada), las cuales se enfrentaron a los anticuerpos inducidos experimentalmente en conejos teniendo un grado de certeza aceptable de que los anticuerpos precipitaron con antígenos mitocondriales; sin embargo es factible que otros organelos o proteínas no mitocondriales pudieran reaccionar con los anticuerpos antimitocondria.

Las variaciones en la cantidad de proteína mitocondrial obtenida de los corazones de perro y el hecho de no encontrar una correlación entre el peso húmedo del corazón y la proteína mitocondrial total, sugiere que existen diversos factores que modifican la relación entre el peso húmedo y la proteína mitocondrial, tales como el estado nutricional, la forma de lisar las células, la cantidad de agua en el tejido cardiaco (8, 5, 7, 11, 13, 30, 41) y en general la metodología.

A pesar de haber inyectado los mismos lotes y concentraciones de antígenos mitocondriales los conejos inmunizados presentaron variaciones en la respuesta inmune humoral; lo que apoya la existencia de cierta susceptibilidad individual para la elaboración de anticuerpos, especialmente contra autoantígenos (1, 6, 14, 16, 17, 33, 34). Además se encontró elevación o disminución en los niveles de anticuerpos dependientes del número de inmunizaciones (1, 8, 16,

17, 33, 34, 36).

En un intento de incrementar el reconocimiento de autoantígenos se sometieron las mitocondrias a un tratamiento directo con tritón X-100 y urea o adicionando estos al gel en que se realizaba la inmunodifusión; sin embargo se observó -- una ligera disminución en el número de bandas debido a que -- probablemente se desnaturalizaban los determinantes antigénicos. Esta disminución también se encontró con el suero y los antígenos solubles de corazón de perro. Por el contrario los antígenos solubles de corazón humano tuvieron un aumento discreto del número de bandas cuando se utilizó tritón X-100 y urea en el agar.

Una posible explicación de la disminución del número de bandas en el agar es que el pH de la mezcla de tritón y urea fue de 6.1, que no es el óptimo para las reacciones inmunológicas de precipitación en gel (8, 24).

Se ha demostrado que algunos antígenos mitocondriales son comunes a varios tejidos e incluso a diversas especies (1, 6, 14, 16, 27, 28, 39), por ello se trató de establecer si con las mitocondrias cardíacas ocurría éste fenómeno -- y con el mismo grado de reacción. Los anticuerpos antimitocondriales de corazón de perro obtenidos en conejos se enfrentaron a las mitocondrias del corazón, hígado y músculo esquelé-

tico del perro, de la rata y del gallo y se encontró que hay reacción cruzada entre estos, presentandose una mayor reacción con los antígenos homólogos, en que se tuvieron hasta 5 bandas de precipitación con el corazón y el hígado, con las mitocondrias de rata solo se formaron 2 bandas de precipitación y con el gallo solo 1 contra corazón e hígado. Por lo tanto si se demostró la existencia de antígenos mitocondriales comunes a varios órganos y especies, pero además hay antígenos mitocondriales órgano y especie específicos (6, 14, 18, 22, 27, 28, 39) ya que lo anterior apoya que en las respuestas autoinmunes policlonales se debe tener cuidado de seleccionar la fuente de antígeno(s) mitocondrial, tanto a nivel de órgano como de especie (17, 25, 27, 43).

Los patrones inmunolectroforéticos con las fracciones mitocondriales de corazón presentaron con la FMC 5 bandas, de las cuales 4 son isoeléctricas y 1 anódica; con la FMP-ligera 3, 2 isoeléctricas y 1 anódica; y la FMP-pesada 1 banda isoeléctrica.

Con las mitocondrias separadas en un gradiente discontinuo de sacarosa solo fue posible demostrar 1 y 3 antígenos (FMP-pesada y FMP-ligera), sugiriendo que éstos pudieran ser propios de las mitocondrias.

La sonicación de las mitocondrias no provocó cambios-

significativos en el número de bandas, lo que indica que no -- hubo pérdida de antígenos conformacionales o desnaturalización.

Las técnicas empleadas en la demostración de anticuerpos mitocondriales muestran que los antígenos se comportan en forma diferente, pues un sistema antígeno-anticuerpo dado se encuentra más fácilmente por contrainmunolectroforesis y -- otros en la microdobleinmunodifusión. Con los antígenos mitocondriales se demostró que la contrainmunolectroforesis tiene mayor grado de sensibilidad (10 veces más sensible que la técnica de microdobleinmunodifusión), ya que concentra a todos -- los componentes inmunológicos en un solo lugar. ©

En general, se encontró una relación directa del número de bandas con la concentración de proteína mitocondrial, -- excepto con las mitocondrias del músculo esquelético de gallo, en donde a pesar de la alta concentración de proteína, no se -- obtuvo ninguna banda de precipitación.

La complejidad molecular de las mitocondrias crudas -- de corazón se puso de manifiesto en la electroforesis en gel -- de acrilamida, en donde existen cuando menos 19 cadenas polipeptídicas de las cuales 5 parecen ser antigénicas. Cuando las mitocondrias se purificaron, la FMP-ligera dió 20 bandas y la FMP-pesada 30, de las cuales posiblemente solo 3 son antigénicas. Las diferencias en el número de bandas pudieran depender-

de la concentración relativa de las proteínas mitocondriales.

Del estudio de la población de sueros humanos, al -- tratar de buscar anticuerpos antimitocondrias, se encontró -- que el 33% de los sujetos cardiopatas presentaron anticuerpos contra mitocondrias, pero pacientes con otras enfermedades -- con manifestaciones cardiacas también tuvieron anticuerpos an -- timitocondrias.

Los donadores de sangre presentaron el 24% de posi-- tividad de anticuerpos antimitocondrias, un porcentaje de -- ellos fueron parientes de sujetos cardiopatas, apoyandose --- que existe una tendencia familiar a presentar autoanticuerpos, lo que se analizará posteriormente en un estudio prospectivo.

De los sueros provenientes de estudiantes universi -- tarios, se encontró que el 18% tuvieron anticuerpos antimitocon -- drias, pero desconocemos si éstos son o no familiares de cardiopatas.

Se podría discutir que los sistemas antígeno-anticuer -- pos que se demostraron por contrainmunolectroforesis, doble -- microinmunodifusión e inmunolectroforesis sean debidos a --- reacciones inespecíficas, sin embargo el lavado exhaustivo de -- los geles con solución salina-borato y después con agua desti -- lada, que disocia la unión "no específica" entre moléculas no -- modificó las reacciones, además si fuera una reacción inespe -- cífica entre las proteínas mitocondriales y serosas se espera --

ría un valor cercano al 100% de positividad, lo cual no ocurrió.

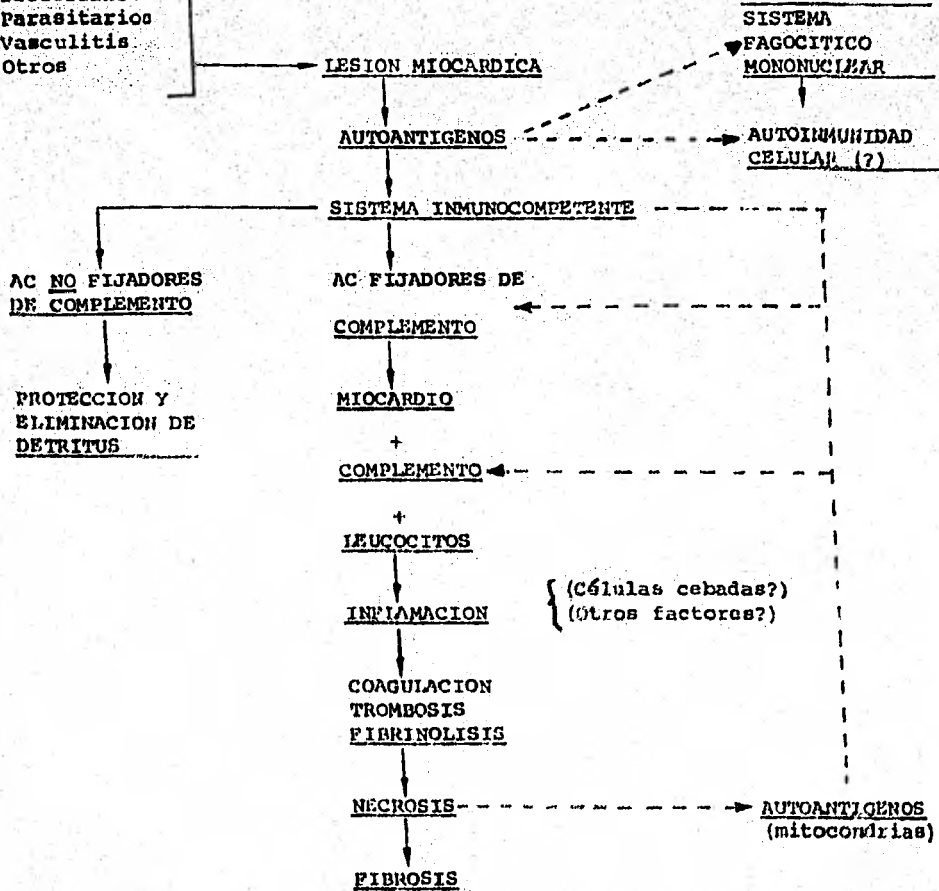
Las observaciones realizadas en éste estudio abren nuevos caminos en la investigación de los autoanticuerpos contra -- mitocondrias en pacientes cardiopatas. No tenemos una explica -- ción clara para la presencia de autoanticuerpos contra mitocon -- drias en los sujetos cardiopatas y es aún más interesante la de -- terminación de éstos en personas aparentemente sanas.

En forma especulativa se piensa que la destrucción de -- células cardiacas libera los antígenos mitocondriales que provo -- carían una respuesta autoinmune humoral y ésto serviría de base -- para la formación de un círculo vicioso, que diera por resulta -- do final lesiones cardiacas incompatibles o no con la vida (9, -- 17, 33, 34). En forma esquemática se muestran algunas posibles -- vías de daño mediadas por autoanticuerpos, complemento y otras -- causas en el infarto del miocardio.

PARTICIPACION DE LA RESPUESTA AUTOINMUNE EN ALGUNAS ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES

Factores desencadenantes:

- Genéticos
- Ambientales
- Hiperlipidemia
- Hipertensión
- Anóxicos
- Tóxicos
- Virales
- Bacterianos
- Parasitarios
- Vasculitis
- Otros



Experimentalmente se demostró que los anticuerpos -- antimitocondria son capaces de modificar el consumo de oxígeno en las mitocondrias y con el complemento por sí solo provocó los cambios en dichos organelos. También fue posible alterar la estructura mitocondrial con los anticuerpos, ya que en las pruebas de hinchamiento hay una diferencia mayor de -- 0.2 unidades de densidad óptica en las mitocondrias cardiacas sometidas al efecto de los anticuerpos y complemento "in vitro".

En estudios realizados por Alarcón y col. (2) se demostró que los anticuerpos anti-RNP son capaces de pasar al interior de células con receptores para Fc y que se puede modificar a las células que tienen anticuerpos anti-RNP en su interior. En éste estudio se puso en evidencia que los anticuerpos antimitocondria modifican la fisiología de las mitocondrias "in vitro", pero aún se requiere probar que las células cardiacas poseen receptores para Fc o bien que hay otros mecanismos moleculares que faciliten la entrada de los autoanticuerpos en las células cardiacas hasta donde se encuentran las mitocondrias.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aho K., Rosted I. and Saris N. (1973). Reactivity of various anticardiolipin antibodies with intact mitochondria. *Clin. Exp. Immunol.* 14: 573-579.
2. Alarcón-Segovia D., Ruíz A and Fishbein E. (1978). Antibody-to nuclear ribonucleoprotein penetrates liver human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature.* 271: 67-69.
3. Altman L.P. and Dittmer S.D. (1964). *Biology data book.* Federation of American Societies for Experimental Biology. p. 306-326.
4. Arquembourg P.C. (1975). *Immunoelectrophoresis.* S.Karger N.Y. 2nd Ed. p. 28-34.
5. Asimakis G.K. and Aprille J.R. (1977). The effect of patient serum on mitochondrial respiration in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 1122-1129.
6. Berg P.A., Roitt I.M., Doniach D. and Horne W.R. (1969). Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. III Characterization of the inner membrane CF antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 4 : 511-525.
7. Calva E., Aoki K., Delgadillo J., López S.F. and Christlieb I. (1974). Immunological identification in plasma of mitochondrial and cytoplasmic aspartate transaminase isoenzymes during experimental myocardial infarction. *Am. Heart J.* 87: 614-618.
8. Campbell D.H., Garvey J.S., Cremer N.E. and Susdorf D.H. (1970). *Methods in immunology.* W.A. Benjamin Inc. New York. 2nd Ed. p. 189-191.
9. Cavelti P. (1945). Autoantibodies in rheumatic fever. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 60: 379-381.
10. Clausen J. (1971). *Immunochemical techniques for their quantification and stimulation of macromolecules.* Eds. T.S. Work E. Work. North Holland. p. 30-70.
11. Cleland K.W. and Slater E.C. (1973). Respiratory granules of heart muscle. *Biochem. J.* 53: 547-556.

12. Deaut J.I., Egly J.M., Ledig M. and Mandel P. (1978). Purification of a soluble ATPase from rat liver mitochondria by AMP-sepharosa affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* 525: 438-445.
13. De Duve C. (1975). Exploring cells with a centrifuge. *Science.* 189: 186-194.
14. De Heer H.D., Pinchard N.R. and Olson S.M. (1972). Autoantigenic specificities of liver mitochondria membranes. *Clin. Exp. Immunol.* 10: 77-87.
15. De Robertis P.E.D., Nowinski W.W., Sáez A.F. (1976). *Biología celular.* El Ateneo. Buenos Aires. 8a. Ed. p. 172-195.
16. Doniach D., Delhanty J., Lindqvist J.H. and Caterall D.R. (1970). Mitochondrial and other tissue antibodies in patients with chronic biological false positive reactions for syphilis. *Clin. Exp. Immunol.* 6: 871-884.
17. Doniach D., Roitt I.M. and Berg P.A. (1969). Liver reactivity. The clinical significance of mitochondrial autoantibodies. *Sherlock S. Erba.* 3a. Ed. p. 62-65.
18. Eiermann W., Aquilla H. and Klingenberg M. (1977). Immunological characterization of the ADP, ATP translocator protein isolated from mitochondria of liver, heart and other organs. *FEBS Lett.* 74: 209-214.
19. Grabar P. et Williams C.A. (1955). Méthode immunoelectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochem, Biophys. Acta.* 17: 67-74.
20. Giclas P.C., Pinchard R.N. and Olson M.S. (1979). In vitro activation of complement by isolated human heart sub-cellular membranes. *J. Immunol.* 122: 146-151.
21. Hadziyannis J.S., Merikas E.G. and Afroudakis P.A. (1970). Hepatitis-associated antigen in chronic liver disease. *Lancet.* 1: 100.
22. Hallermayer G. and Newport W. (1974). Immunological difference of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes of Neurospora crassa. 41: 264-268.
23. Hinkle P.C. and Mc. Carty R. (1978). How cells make ATP.

Scientific American. 238: 104-123.

24. Hudson I. and Hay C.F. (1976). Practical immunology. Blackwell Scientific Publications. Great Britain, Oxford. p. 88-124.
25. Kelley R.E., Olson S.N. and Pinckard R.N. (1975). Characterization of autoantigenic sites on isolated dog heart mitochondria. Biochem. Biophys. Acta. 401: 370-385.
26. Kelley R.E., Olson S.M. and Pinckard R. N. (1974). Characterization of anti-heart mitochondrial autoantibodies produced in dogs following myocardial infarction. Cir. Res. 35: 862-870.
27. Kolarow J., Kuzela S., Krempasky V., Lakota J. and Ujhazy V. (1978). ADP, ATP translocator protein of rat heart, liver and hepatoma mitochondria exhibits immunological --- cross-reactivity. FEBS Lett. 96: 373-376.
28. Labro M.T., Andrieu M.C., Weber M. and Homberg J.C. (1978) A new pattern of non-organ and non-species-specific anti-- organelle antibody detected by immunofluorescence: the -- mitochondrial antibody number 5. Clin. Exp. Immunol. 31:- 357-366.
29. Lauf K.P. (1974). Erythrocyte surface antigens and cation transport. Ann. N.Y. Acad. Sci. 242: 324-241.
30. Lehninger A. (1978). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función. Ed. Omega. Barcelona. p. 519-553.
31. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
32. Marrack J.R. (1963). Sensitivity and Specificity of methods of detecting antibodies. Brit. Med. Bull. 19: 178-182.
33. Martínez R.D., Balseiro L. y Lomelí M. (1975). La cinética de la respuesta inmune inducida por los antígenos cardiacos. Arch. Inst. Nal. Cardiol. (Méx.) 45: 720-736.

34. Martínez R.D., Bialostozky D. y Bassoti R. (1978). Estudio inmunológico en pacientes con infarto agudo del miocardio. Arch. Inst. Nal. Cardiol. 48: 414-436.
35. Martínez R.D. and Montfort. (1973). A study of the specificity of alveolar macrophage antigen(s). Immunology. 25: 197-203.
36. Martínez R.D., Tarrab-Hazdai R., Aharonov A. and Fuchs S. (1977). Cytophilic antibodies in experimental autoimmune-Myasthenia gravis. J. Immunol. 118: 17-20.
37. Mela L., Miller L.D., Diaco J.F. and Sugerman H.J. (1970). Effect of E. coli endotoxin on mitochondrial energy-linked function. Surgery. 68: 541-549.
38. Nelson D. and Mendel-Hartvig I. (1977). Immunological Studies on beef heart ubiquinol-cytochrome c reductase (complex III). Eur. J. Biochem. 80: 267-274.
39. Ohta G., Nonomura A. and Nishimura I. (1976). Leucocyte migration inhibition with inner and outer membranes of mitochondria and insoluble hepatocyte surface membranes prepared from rat liver in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 26: 491-504.
40. Párr G. and Nelson D.B. (1977). Topology of the peptides in free and membrane-bound complex III (ubiquinol-cytochrome c reductase) as revealed by lactoperoxidase and p-diazonium benzene (³⁵S) sulfonate labeling. J. Biochem. 80: 275-282.
41. Pérez Tamayo R. (1975). Patología molecular, subcelular y celular. La Prensa Medica Mexicana. Méx. D.F. p. 265-292.
42. Schotz M.C, Twu J.S., Pedersen M.E., Chen C.H., Garfinkel A.S. and Borensztajn J. (1977). Antibodies to lipoprotein lipasa application to perfused heart. Biochem. Biophys. -- Acta. 489: 214-244.
43. Smitherman T.C., Mukherjee A., Robinson J.B., Butsch R.W., Richards E.G. and Srere R.A. (1979). Human heart citrate synthase: purification, properties, kinetic and immunologic studies. J. Mol. Cell. Cardiol. 11: 149-160.

44. Vereb G., Gergely P. and Bot G. (1977). Studies on heart isophosphorilases by means of immunotitration. *Biochem. - Biophys. Acta.* 12: 237-244.
45. Villanueva R.J. (1970). *La célula viva*. Scientific American Ed. Blume. Madrid. p. 105-113 y 136-158.
46. Wadsworth C.A. (1962). A microplate technique employing a gel chamber compared with other micro-and macroplate techniques for immune diffusion. *Int. Arch. Allergy.* 21: 131-137.
47. Weber K. and Osborn M. (1969). The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrylamida gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.