

ESTUDIO DE AUTO-ANTICUERPOS EN MIOCARDITIS ALERGICA EXPERIMENTAL

C. KOZMA, R. JAFFE Y W. G. JAFFE

En trabajos anteriores, uno de nosotros y sus colaboradores describió lesiones miocárdicas producidas artificialmente por sensibilización de animales experimentales con extracto de corazón homólogo (Jaffé 1946, 1948, 1949) (Jaffé y Di Prisco 1950) (Jaffé 1954) (Jaffé y Gavaller 1954). Estas observaciones han sido reexaminadas y comprobadas por Muth (1953). Koeberle (1958) las pone en duda. Sin embargo, no aporta ningún dato experimental para apoyar su negativa.

En los estudios anteriores, las conclusiones se basaron en los hallazgos histológicos. En el presente trabajo se ha investigado simultáneamente el aspecto serológico mediante electroforesis en papel y la reacción de precipitación en agar.

MATERIAL Y METODO

Fueron utilizados 14 conejos sanos de 1.500 gramos aproximadamente, de los cuales 5 sirvieron de controles. A 4 conejos se les inyectó, por vía intravenosa, 10 ml. de extracto de corazón de conejo al 4 % en solución salina fisiológica, en 3 días consecutivos; después de 4 semanas se repitieron 2 inyecciones de 10 ml. con solución al 1 %. A los otros 5 conejos se les inyectó por vía intramuscular, región inguinal, extracto de corazón de conejo en la misma concentración, pero emulsionado en aceite de parafina con el detergente "Atlox" (*). Se inyectaron 4 ml. de una sola vez, 2 en cada lado, semanalmente, durante 4 semanas.

Trabajo del Departamento de Investigaciones Científicas del Instituto Anatómico-Patológico, Universidad Central, Caracas. Presentado en el II Congreso Panamericano de Anatomía Patológica en Sao Paulo.

* Industrial Chemicals Department. Atlas Powder Company, Wilmington, 99. Delaware.

Los corazones de los animales sacrificados fueron examinados en cortes histológicos con los métodos de fijación y coloración corrientes: Formol, H & E, Masson, Weigert van Gieson.

Los animales de control no recibieron inyecciones; se estudiaron exactamente igual como los otros, es decir, serológica e histológicamente.

Los antígenos fueron preparados con control de esterilidad y con una concentración de 14 miligramos de nitrógeno por ciento.

Las proteínas plasmáticas fueron determinadas por electroforesis en papel, según el método de Grassman-Hanning (1951) y por reacción de difusión-precipitación en placas de agar-agar, usando como antígeno un extracto de corazón de conejo.

Las determinaciones fueron hechas después de 4 semanas de la última inyección y se repitieron cada segunda semana. Cada animal se examinó así 4 veces; todos fueron sacrificados con aspiración en la vena oreja en la décima semana.

RESULTADOS

a) Serológicos: Los resultados de las curvas electroforéticas demostraron, en las primeras 2 determinaciones, en los 9 conejos, una hipoalbuminemia con aumento de las alfa y gamma-globulina. En los últimos 2 exámenes en los conejos inyectados con antígeno en solución fisiológica, se observó una ligera disminución de gamma-globulina, manteniéndose las otras fracciones como en las determinaciones anteriores.

Los 4 conejos inyectados con antígeno en emulsión de aceite de parafina, mostraron aumento acentuado de gamma-globulina. El quinto animal murió espontáneamente en la séptima semana. Tenía una tasa muy baja de gamma-globulina y muy alta de la fracción alfa 2.

La reacción de difusión-precipitación en agar-agar fue negativa en los 9 conejos en las dos primeras determinaciones. En la octava y décima semanas se encontró el suero de 4 de los 5 conejos inyectados con antígeno en emulsión de parafina con reacción de precipitación positiva. Los conejos inyectados con antígeno en solución fisiológica dieron reacciones negativas hasta el final de los experimentos.

b) Histológicos: Los corazones de todos los conejos en experimentación eran muy flácidos, la musculatura de color rosado pálido, turbia, como la carne cocida.

Histológicamente todos mostraron lesiones necrobióticas, hasta necrosis completa de muchas fibras musculares. Casi no había grasa, el núcleo celular había desaparecido, el protoplasma era turbio, granuloso y se observó destrucción de la fibra de grado y extensiones variables, a veces más focales en otros cortes más difusos, ocupando varios campos de vista de pequeño aumento. Las lesiones variaban solamente con respecto al grado; ellas toman mayor extensión e intensidad en los animales con reacciones inmunológicas positivas. Esta diferencia gradual es muy clara, siendo el proceso más difuso y más marcado en los conejos inmunológicamente positivos. En los otros había solamente lesiones sin destrucción intensa.

Ocasionalmente se vieron pequeños infiltrados por pequeñas células redondas, especialmente en los animales sin modificaciones serológicas. Estas infiltraciones son probablemente un proceso secundario a lesiones degenerativas, encontrándose escasamente cuando éstas son pronunciadas; más frecuentes en casos ligeros. Así es explicable que en los experimentos presentados, nunca vimos infiltraciones tan extensas como las descritas anteriormente, y además se encontraron más infiltraciones en los animales que tenían lesiones necrobióticas de menos intensidad.

Resumiendo, se puede decir que encontramos en todos los conejos tratados con extracto cardíaco homólogo, lesiones miocárdicas, y que su intensidad es paralela a las reacciones inmunológicas.

D I S C U S I Ó N

El estudio de la gráfica N° 1, permite ciertas interpretaciones sobre el posible mecanismo de la producción de las lesiones histológicas. La inyección de extracto de corazón homólogo provocó un aumento de las gamma-globulinas que puede interpretarse como reacción alérgica. En el grupo de animales tratados con el extracto acuoso, esta reacción de-

clinó después de la terminación de las inyecciones, lo que se manifestó en una reducción continua de la mencionada fracción globulínica a partir de la alta concentración inicial. Las lesiones cardíacas concomitantes eran moderadas. En los animales que se inyectaron con la emulsión de extracto de corazón en aceite de parafina, se observó un segundo aumento de la concentración de las gamma-globulinas en la sangre a partir de la sexta semana, después de la primera inyección sensibilizante, y continuó aumentando hasta el final del experimento. Conjuntamente con este fenómeno se obtuvieron precipitaciones usando suero y extracto de corazón de conejo. Sólo en estos animales se observaron las lesiones cardíacas más severas.

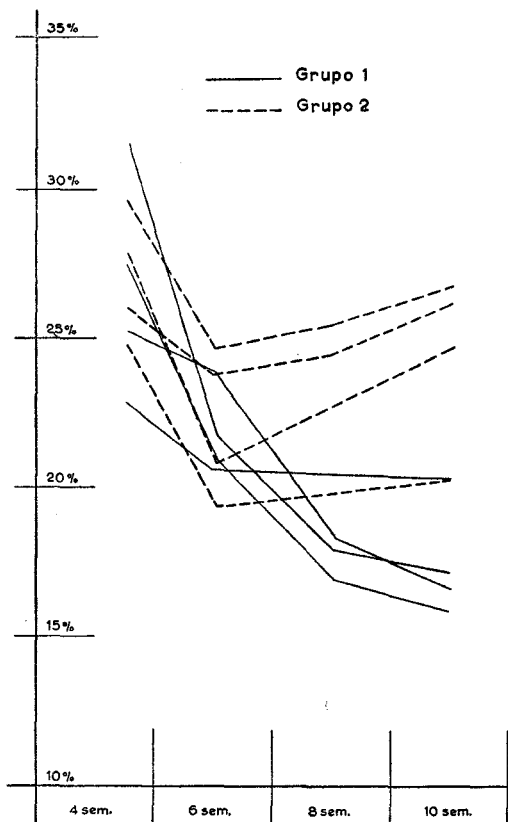


Fig. 1.—Tasa de gamma globulina en los grupos 1 y 2.

Es de suponer que en el primer proceso de sensibilización se formen anticuerpos contra uno o varios de los compuestos

del extracto de corazón sensibilizante. Ellos reaccionan con él o los antígenos; pero en los casos de los animales del segundo grupo experimental, probablemente por la acción del aceite de parafina como coadyuvante, se comportaron simultáneamente como endo-antígenos y reaccionaron contra las células miocárdicas del propio animal, produciendo la liberación de protoplasma cardíaco. Este, a su vez, provoca una nueva reacción inmunológica que se manifiesta por el segundo ascenso en las gamma-globulinas y la aparición de la reacción de precipitación entre suero y extracto de corazón. Así, las lesiones destructivas se deberían a la formación de auto-antígenos, cuya formación fue provocada por la aplicación de antígenos homólogos y la cual, a su vez, causó la aparición de auto-anticuerpos (Voisin 1955).

En la evolución de la miocarditis chagásica se puede tratar de una serie de reacciones parecidas. En este caso, posiblemente la liberación de protoplasma cardíaco se debe a la rotura de fibras musculares en el miocardio provocada por los parásitos. La repetición de este proceso puede provocar la sensibilización y el proceso desencadenante podría ser igual al que postulamos para explicar los resultados de este trabajo.

Este mecanismo parece análogo al descrito por Hamashima (1958) (no pudimos leer el trabajo original), quien demostró el carácter de auto-antígeno de la mioglobulina con capacidad de producir miocarditis. Quedará por estudiar cuál de los componentes del extracto sensibilizante por nosotros usado es responsable por esta reacción.

TABLE I

	ANTIGENO	ELECTROFESIS					DIFUSION PRECIPITACION EN GEL	RESULTADO HISTOLOGICOS	
		ALB	γ ₁	γ ₂	B	γ		PROC. REACCION	INFILTRADOS
CONEJOS DE CONTROL		53.16 ± 5	2.24 ± 0.66	10.60 ± 1.28	16.69 ± 4.75	13.46 ± 0.90		—	—
CONEJO N°1 CO-KO 1	ANT. COR. CON C/SOL. FIS.	49.03	4.63	9.16	15.11	22.07	—	+	—
CONEJO N°2 CO-KO 2	ANT. COR. CON C/SOL. FIS.	53.52	9.39	4.56	12.23	20.30	—	+	+
CONEJO N°3 CO-KO 3	ANT. COR. CON C/SOL. FIS.	46.52	4.86	10.36	13.92	24.54	—	+	+
CONEJO N°4 CO-KO 4	ANT. COR. CON C/SOL. FIS.	47.72	6.48	12.22	12.35	21.25	—	+	+
CONEJO N°5 D-R 1	ANT. COR. CON C/EMUL. AC. PAR	44.46	3.81	12.76	17.48	21.47	+	1:8	+
CONEJO N°6 D-R 2	ANT. COR. CON C/EMUL. AC. PAR	41.88	3.57	12.13	17.94	24.48	+	1:8	+
CONEJO N°7 D-CO 2	ANT. COR. CON C/EMUL. AC. PAR	39.88	7.87	10.28	14.94	27.03	+	1:8	+
CONEJO N°8 D-CO 3	ANT. COR. CON C/EMUL. AC. PAR	45.77	4.38	8.89	15.67	25.29	—	+	+
CONEJO N°9 D-CO 1	ANT. COR. CON C/EMUL. AC. PAR	41.94	5.68	21.29	20.27	10.32	+	1:8	+

Tasa de las diferentes fracciones proteicas. Resultados histológicos.

RESUMEN

En trabajos anteriores se demostró que el extracto de corazón homólogo era capaz de producir lesiones miocárdicas, comprobadas histológicamente.

En el presente trabajo se demuestran, además de las lesiones microscópicas, modificaciones en la electroforesis del suero.

Se usaron dos tipos de vehículo para preparar el extracto de corazón: solución salina fisiológica y aceite de parafina con el detergente Atlox. El primer extracto, es decir, el de la solución salina, se inyectó por vía intravenosa a 5 conejos, y el otro, conteniendo parafina, por vía intramuscular a 4 animales. Como controles se usaron 5 animales.

Serológicamente, los resultados de las curvas electroforéticas demostraron en las primeras 2 determinaciones, en los 9 conejos, una hipoalbuminemia con aumento de las alfa y gamma-globulinas. En los últimos 2 exámenes, en los conejos inyectados con antígeno en solución fisiológica, se observó una ligera disminución de gamma-globulinas, manteniéndose las otras fracciones como en las determinaciones anteriores.

Los 4 conejos inyectados con el antígeno en emulsión de aceite de parafina mostraron aumento acentuado de gamma-globulinas. El quinto animal murió espontáneamente en la séptima semana. Tenía una tasa muy baja de gamma-globulina y muy alta de la fracción alfa 2.

La reacción de difusión-precipitación en gel de agar fue negativa en los 9 conejos en las 2 primeras determinaciones. En la octava y décima semana se encontró el suero de 4 de los 5 conejos inyectados con antígeno en emulsión de parafina con reacción de precipitación positiva. Los conejos inyectados con antígeno en solución fisiológica dieron reacciones negativas hasta el final de los experimentos.

Las lesiones miocárdicas fueron más severas en los animales inyectados con la emulsión de parafina y Atlox.

Estos resultados se interpretan hipotéticamente de la siguiente manera: los anticuerpos que se forman por la inyección de extracto de corazón atacan las miofibrillas cardíacas, las cuales actúan como autoantígenos que a su vez producirían autoanticuerpos, los cuales son demostrables con la reacción de precipitación en gel agar.

Se discute la posible analogía con la evolución de miocarditis chagásica.

S U M M A R Y

In previous work we demonstrated that an homologous extract of heart was capable of producing myocardial lesions, histologically proved. In the present work we have demonstrated, in addition to the microscopic lesions, electrophoretic modifications of the serum. We used two types of vehicles to prepare the heart extract: (1) a physiologic saline solution, and (2) paraffin oil with the detergent Atlox. The saline extract was injected intravenously into 5 rabbits, and the paraffin extract was injected intramuscularly into 4 animals. Five rabbits served as controls.

Serologically the results of the electrophoretic curves demonstrated, in the first two determinations in 9 rabbits, a hypoalbuminuria and an increase in alpha and gamma globulin. In the last two examinations, in rabbits injected with antigen in physiologic saline solution, we observed a slight diminution of the gamma globulin, the other fractions being the same as in the previous determinations. Four rabbits injected with the antigen in emulsion of paraffin had a marked increase of gamma globulin. The fifth animal, which died spontaneously in the seventh week, had a decrease in gamma globulin and an increase in the alpha-2 fraction. The reaction of precipitation diffusion in agar was negative in 9 rabbits in the first two determinations. During the eighth and tenth weeks, the serum of 4 of the 5 rabbits injected with the antigen in emulsion of paraffin gave a positive precipitation reaction. The rabbits injected with antigen in physiologic saline solution gave negative reactions up to the end of the experiments. The myocardial lesions were more severe in animals injected with emulsion of paraffin and Atlox.

The results may be interpreted hypothetically in the following way: The antibodies formed by the injection of the extract of heart attack the myocardial fibers which act as autoantigens. The latter in turn would produce autoantibodies which can be demonstrated by the precipitation reaction in agar. The possible analogy with the evolution of Chagasic myocarditis is discussed.

REFERENCIAS

- Grassman, W., Hanning, R. y Knendel, M. (1951). — *Deutsch. Med. Woch.* 76:333.
- Hamshima, Y., Acki, Y. y Bang, H. (1958).—*Sem. Méd.* 112:295.
- Jaffé, R. (1946).—*Rev. Sudameric. de Morfol.* 42:107.
- Jaffé, R. (1948).—*Exp. Med. and Surg.* 62:189.
- Jaffé, R. (1949).—*Frankf. Z. f. Path.* 60:309.
- Jaffé, R. (1948).—*Arch. de la Soc. Argent. de Anat. Normal y Patol.* 10:177.
- Jaffé, R. y Di Prisco, J. (1950).—*Acta Cient. Venez.* 1:120.
- Jaffé, R., Gavaller, B. y Domínguez, A. (1954).—*Arch. Venez. de Patol. Tropical* 2:183.
- Jaffé, R. (1956).—*Frankf. Z. f. Path.* 67:456.
- Koerberle, F. (1958).—*O. Hospital* 53:580.
- Muth, S. (1953).—*Frankf. Z. f. Path.* 64:235.
- Voising, G. (1955).—*Les Maladies avec auto-anticorps. Rapports présentés dans le XXX Congrès Français de Medecine. Alger. pág. 225. Paris. Masson & Cia.*

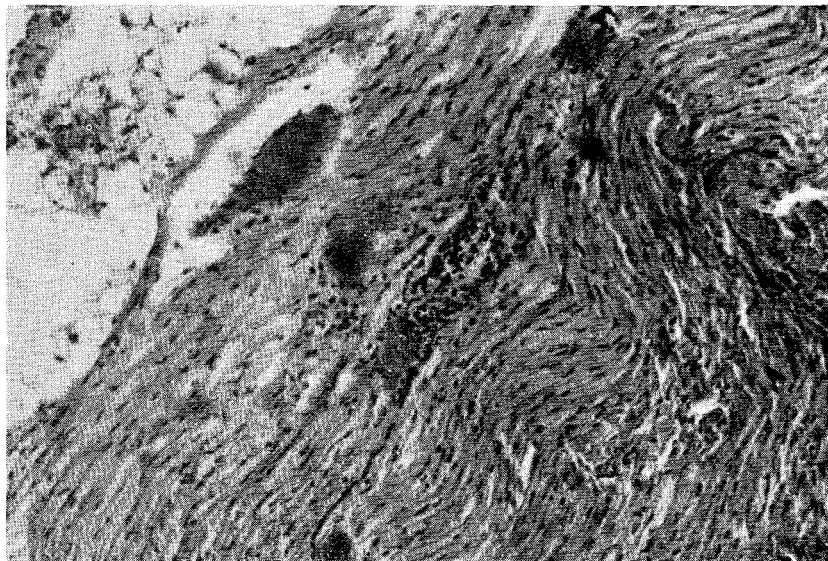


Fig. 1.—Corazón de conejo inyectado con extracto cardíaco homólogo. Infiltraciones de pequeñas células redondas. Hematoxilina & Eosina, 60 x.

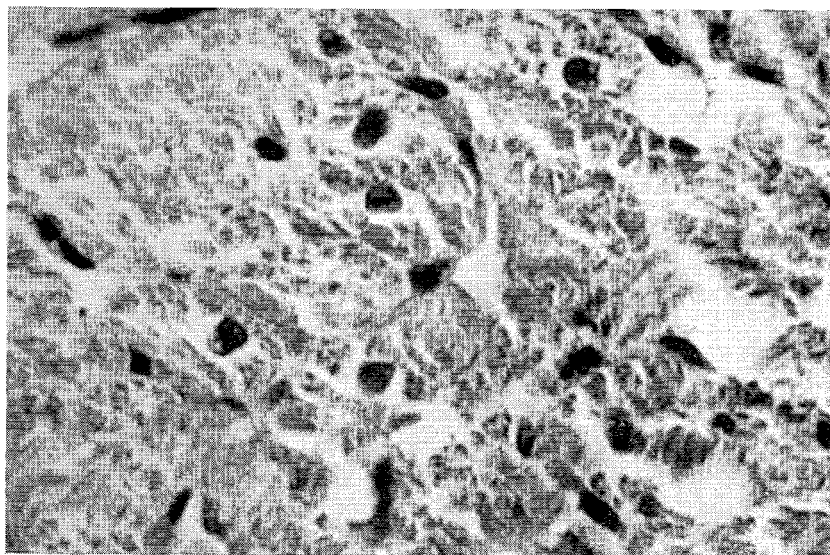


Fig. 2.—Corazón de conejo inyectado con extracto cardíaco homólogo. Necrobiosis (miolisis) de las fibras cardíacas. Hematoxilina & Eosina, 450 x.