

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE ¹⁷ ₂₄

**INCORPORADA A LA U.N.A.M.
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**

**OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES
ANTI-MIOSINA CARDIACA**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
GISELA HAYDE RICO PORRAS**

Q.F.B. JOSE ANTONIO GARCIA MACIAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN MEXICO. D.F.

1997.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE
DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ", BAJO LA
DIRECCIÓN DEL Dr. FELIPE MASSO ROJAS Y CON EL
APOYO FINANCIERO DEL PROYECTO DE
INFRAESTRUCTURA CONACYT No. F554.**

Agradezco muy especialmente al **Dr. Luis Felipe Montaña Estrada**, al **Dr. Felipe Masso Rojas** y a la **MC Araceli Paez Arenas** por haberme dado la oportunidad de integrarme a su tan excelente equipo de trabajo, por su ayuda, comprensión y colaboración con la realización del mismo, así como por la amistad y confianza que me han brindado ya que todas estas enseñanzas aprendidas han sido de significial importancia para mi desarrollo personal y profesional.

Así mismo agradezco a :

Dra. Verónica Warner, QBP. Guadalupe Hernández
MC Emma Rodríguez, Dra. Ma. Teresa Collados
Biol. Elvira Varela, Biol. Mario Morales
Dr. Vicente Ruiz, MC Roxana Garbo y
Dra. Teresa Hernández

Por el compañerismo y la gran amistad que me brindaron durante el desarrollo del presente trabajo en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez."

A **Dios** por haberme dado la Vida.

A mis Padres **Francisco Rico** y **Clara Luz Porras** a quienes admiro, respeto y debo todo lo que soy ; que con su ejemplo y apoyo me enseñaron a seguir siempre adelante formando las bases de mis éxitos.

A mis hermanos **Roberto** y **Luz Elvira** a quienes quiero y respeto por todo lo vivido en el camino recorrido y por la gran amistad que tenemos.

A mi novio **Miguel Angel Amador** por su gran ayuda, comprensión, solidaridad y amor que me ha brindado durante todo este tiempo.

A mis amigos **Blanca Ríos** ,**Mara Zepeda**, **Ale Acosta**, **Isabel Monteón**, **Vania Nava**, **Enrique Herrera**, **Conie Miyamoto**, **Abigail Gallegos**, **Malu Romero**, **Lalo Zarzoza**, **Liliana Torres**, **Vero Vega**, **Silvia Acevedo**, y **Gerardo Galicia** por la amistad que me brindaron a lo largo de la carrera universitaria.

ÍNDICE

	Páginas
1 RESUMEN	1
2 GENERALIDADES	4
2.1 Infarto Agudo del Miocardio (IAM)	4
2.2 Causas Ateroscleróticas del IAM	5
2.3 Causas No Ateroscleróticas del IAM	6
2.4 Observaciones Microscópico Histopatológicas del IAM	8
2.5 Mecanismos de Contracción y Relajación Muscular	9
2.6 Proteínas de los elementos contráctiles.	12
2.6.1 Miosina	13
2.6.2 Actina	14
2.6.3 Troponina y tropomiosina	15
2.7 Tratamiento empleado en el IAM	17
2.8 Diagnósticos del IAM	19
2.9 Miocarditis	26
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 Extracción de la Miosina Cardíaca Canina	30
4.2 Purificación de la Miosina Cardíaca Canina	31
4.3 Producción de Anticuerpos Policlonales Anti-Miosina	33
4.4 Pruebas Inmunohistoquímicas	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Extracción de la Miosina Cardíaca Canina	35
5.2 Purificación de la Miosina Cardíaca Canina	37
5.2.1 Por Precipitación con Sulfato de Amonio	37
5.2.2 Por Electroelución	38
5.2.3 Por Isoelectroenfoque	39
5.3 Producción de anticuerpos Policlonales Anti-Miosina	41
5.4 Reconocimiento de las fracciones de Miosina Canina por Anticuerpos Policlonales	42
5.5 Pruebas Inmunohistoquímicas	44
6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	45
7 BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE ABREVIATURAS

IAM	Infarto Agudo al Miocardio
IM	Infarto al Miocardio
ECG	Electrocardiograma
P,Q,R,S,T.	Deflexiones del Electrocardiograma
DPD	Ac.Difosfono-propano-dicarboxílico
Tc ^{99m} DPD	Ac.Difosfono-propano-dicarboxílico marcado con tecnecio
In ¹¹¹ -AAM	Anticuerpos Anti-Miosina marcados con Iudio
SK	Estreptocinasa
UK, U-PA	Urocinasa
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
Pro-UK, scu-PA	Pro-Urocinasa
rt-PA	Recombinante del Activador tisular del plasminógeno
CK	Creatinincinasa
TGO	Transferasa-Glutámico-oxalo acética
DHL	Deshidrogenasa láctica
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
Kd	Kilodaltones
PM	Peso molecular
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
INC	Instituto Nacional de Cardiología
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adeosina
AMPc	Monofosfato de Adenosina cíclico
ATPasa	Enzima ATPasa
EMC	Encéfalo virus
SDS	Dodecil sulfato de sodio
CH ₃ OH	Etanol
CH ₃ OH	Metanol
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio
Na ₂ H ₂ PO ₄	Fosfato dibásico de sodio
K ₂ H ₂ EGTA	Etilenglicol-bis (beta-amino-etil-eter) N,N' tetra-acetato de potasio.
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
NaCl	Cloruro de sodio
KCl	Cloruro de potasio
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metil-etil-enediamina
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
H ₂ N ₂ O ₈ S ₂	Persulfato de amonio
CH ₃ COOH	Ácido acético
C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na ₂ ATP	Adenosil-trifosfato de sodio
TRIZMA-BASE	Tris (hidroximetil) amino-metano

1 RESUMEN

El corazón es considerado como la bomba motriz que mantiene la sangre en circulación por todo el organismo ; es un órgano formado por tejido muscular y presenta un tabique interventricular que lo divide en su parte media, limitado por 4 cavidades; 2 aurículas y 2 ventrículos la mitad derecha dirige la sangre a los pulmones, mientras que la izquierda recibe la sangre oxigenada de éstos conduciéndola a la circulación general. Las enfermedades del corazón pueden presentarse en una amplia variedad de formas (angina de pecho, aterosclerosis, arritmias cardiacas, infarto al miocardio, etc.) sus causas pueden ser congénitas o adquiridas. Las alteraciones tisulares durante un infarto agudo al miocardio (IAM) consisten en isquemia, lesión y muerte de las células.

A pesar de que existen numerosos síntomas durante la fase aguda del IAM el más característico es un dolor intenso persistente en la región precordial irradiado a menudo hacia el brazo izquierdo pudiendo éste estar acompañado de sofocación, palidez, diaforesis fría, pulso rápido y disminución de la presión arterial .

La causa más frecuente del infarto al miocardio es una trombosis coronaria frecuentemente provocada por irregularidades en la pared del vaso sanguíneo secundarias a aterosclerosis.

En la actualidad no se cuenta con un solo método de diagnóstico óptimo ; pero existen varias técnicas que en conjunto forman un diagnóstico adecuado, estas técnicas son: la Electrocardiografía, la Ecocardiografía, la Angiocardiógrafa , la Biopsia y la Medicina Nuclear.

En 1974 ¹ se reportó el empleo del ácido difosfano-propano-dicarboxílico (DPD) marcado con Tc ^{99m}, para su uso en la gammagrafía cardiaca con fin de diagnóstico para la detección del

IAM sin onda Q. Esta técnica se basa en la unión de los radiofosfatos al calcio depositado principalmente en las mitocondrias liberado de las células necrosadas.

Doce años después, en 1986 ² se desarrolló otro método basado en el uso de anticuerpos monoclonales anti-miosina, marcados con In^{111} . Los anticuerpos pueden atravesar la membrana de las células lesionadas y unirse específicamente a la miosina, la especificidad en este caso es mayor debido a que implica una reacción antígeno-anticuerpo. En un estudio comparativo ¹ de estas metodologías se demostró que la gammagrafía con radiofosfatos es capaz de detectar el 44% de los casos con IAM, mientras que en la gammagrafía con anticuerpos anti-miosina se diagnosticó el 58%, en este trabajo en la mayoría de los casos (más del 85%) el infarto se localizaba en la zona inferoposterior del corazón. A pesar de que la eficacia de la gammagrafía con anticuerpos anti-miosina es la más elevada y no se producen efectos adversos, el alto costo de este método no permite su empleo generalizado, en nuestro país, por lo que su uso está limitado a algunos hospitales privados y sólo en aquellos casos en los que la detección planar y la tomografía con radiofosfatos marcados con tecnecio son negativas.

El objetivo del presente trabajo es el establecimiento de la metodología para la obtención de anticuerpos policlonales anti-miosina cardíaca canina para posteriormente producir anticuerpos monoclonales anti-miosina cardíaca, ya que esta tesis forma parte del proyecto "Anticuerpos monoclonales anti-miosina con fines de uso diagnóstico" a nivel hospitalario en nuestro país; ya que debido al alto costo de los anticuerpos comerciales anti-miosina ya existentes en el mercado, no todos los pacientes con padecimientos cardíacos pueden tener acceso a ellos para un método de diagnóstico rápido, efectivo y no invasivo.

La miosina fue extraída de corazón canino mediante solubilización diferencial de la proteína en cloruro de potasio (KCl), para su purificación se emplearon tres metodologías comparativas, las cuales fueron: precipitación con sulfato de amonio, electroelución y separación por punto isoeléctrico. Este último proporcionó la pureza y concentración suficientes para la inmunización de los ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad con una dosis de 6µg de proteína + 100µl de adyuvante incompleto de Freund; administrada por vía intraperitoneal cada 15 días por 2 meses para inducir la producción de los anticuerpos policlonales anti-miosina. Posteriormente a la inmunización de los ratones se sangraron para probar y titular los anti-sueros policlonales por ELISA, obteniéndose títulos de 1:6400 y en inmunotransferencias el título fue de 1:5000.

Con el anti-suero policlonal de los ratones inmunizados, se realizaron pruebas inmunohistoquímicas con las cuales se demuestra que los anticuerpos policlonales anti-miosina reconocen la miosina que se encuentra en las células lesionadas en el tejido infartado humano.

Concluyéndose de esta manera que con la metodología empleada para la extracción de miosina se obtuvo de manera rápida la miosina nativa, la cual está altamente enriquecida. La purificación por precipitación con sulfato de amonio puede ser utilizada inicialmente ya que con dicha técnica se eliminan muchos contaminantes. Con la técnica de electroelución se obtiene una proteína de mayor peso molecular pero la concentración fue mínima; presentando problemas de agregación a la hora de concentrarla y finalmente con la purificación por isoelectroenfoque nos proporcionó dos fragmentos de miosina, con los que se inmunizaron a los ratones obteniéndose así los anticuerpos policlonales, con los cuales en pruebas

immunohistoquímicas de tejido infartado humano, estas reconocieron la miosina que se encuentra en las células lesionadas.

Con este trabajo se estableció la metodología para la purificación de miosina cardíaca y se obtuvieron anticuerpos murinos policlonales anti-miosina. Posteriormente a los animales inmunizados se les empleará en el proyecto titulado "Anticuerpos monoclonales anti-miosina con fines de uso diagnóstico" llevándose a cabo actualmente en el Departamento de Biología Celular del INC.

2 GENERALIDADES

2.1 INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO (IAM) :

En México como en Europa y en Estados Unidos el infarto agudo al miocardio (IAM) es considerado como un problema de salud pública, en este último país, cada año casi 1 500 000 personas sufren de IAM ¹ lo que representa al rededor del 25% de las muertes en general.

Más del 60% de las muertes ligadas al IAM ocurren dentro de la primera hora del suceso y se deben principalmente a arritmias y particularmente a fibrilación ventricular. La mortalidad en el hospital y un año posterior al infarto son cercanas al 10% en cada caso.

El IAM es la máxima expresión de la insuficiencia coronaria y se traduce patológicamente por la existencia de necrosis en una zona localizada del músculo cardíaco, como consecuencia de una isquemia y lesión del mismo. Entre los síntomas de la fase aguda, el más característico es un dolor precordial intenso y persistente. En la mayor parte de los casos este dolor se acompaña de ansiedad, sofocación, diaforesis fría, pulso rápido, náuseas, vómito y baja de la presión arterial.

Aparecen también trastornos en la conducción eléctrica que se manifiestan por cambios en el electrocardiograma (ECG), ya sea alteraciones en la onda T, desniveles del segmento ST y/o anomalías en la onda Q.

2.2 CAUSAS ATEROSCLERÓTICAS DEL IAM :

Casi todos los infartos miocárdicos (IM) se deben a aterosclerosis de las arterias coronarias a las cuales se les superpone una trombosis coronaria, dando como resultado final la disminución de luz de las arterias coronarias, lo cual a su vez disminuye el aporte sanguíneo al miocardio. Cuando el riego coronario disminuye por debajo de cierto valor crítico, las fibras miocárdicas desarrollan una lesión isquémica, cuando ésta es más grave, o persiste por más tiempo, se produce un daño miocárdico irreversible, es decir, un infarto miocárdico. En la mayoría de los estudios llevados a cabo en necropsias, las placas ateroscleróticas que se acompañan de trombosis y oclusión total, localizadas en los vasos relacionados con el infarto, suelen ser más complejas e irregulares que las observadas en los vasos no ligados al IM⁵. Los estudios histológicos de estas lesiones a menudo revelan ruptura o fisura de las placas^{6,7}. La morfología angiográfica que permite sospechar de rotura de placas se observa en casi todas las estenosis ligadas a IAM o al comienzo súbito de una angina de pecho inestable^{8,9}.

A raíz de los trabajos de J.B.Herrick, los cardiólogos sospechaban la existencia de una relación causa-efecto entre trombosis coronaria e infarto de miocardio, pero la prueba más contundente la aportó el equipo de De Wood, quienes practicaron en 322 pacientes afectados de infarto de miocardio una coronariografía, la observación del trayecto del producto de contraste y su estancamiento en las coronarias les permitió demostrar que más del 80% de los pacientes presentaban una trombosis coronaria en las 6 primeras horas del infarto. De esto

deriva la idea de emplear medicamentos trombolíticos capaces de disolver el coágulo arterial¹⁰. Durante la necrosis, los trombos coronarios tienen una longitud aproximada de 1 cm, en casi todos los casos¹¹ y se encuentran adheridos a la superficie interna de las coronarias.

La composición de los trombos varía en diferentes grados; hay trombos compuestos por plaquetas y fibrina; y otros compuestos por eritrocitos, fibrina, plaquetas y leucocitos¹⁰.

2.3 CAUSAS NO ATEROSCLERÓTICAS DEL IAM :

Existen numerosos procesos patológicos distintos a la aterosclerosis que a veces afectan a las arterias coronarias y causan infarto del miocardio¹². Muchos procesos inflamatorios producen anomalías en las arterias coronarias, algunas de las cuales llegan a simular una enfermedad aterosclerótica. Entre estos procesos se encuentran las infecciones causadas por el virus Coxsackie B, que son una causa rara de IAM¹³, la aortitis sifilítica, que puede producir la oclusión de uno o ambos orificios coronarios¹⁴ y la tripanosomiasis causada por el parásito Trypanosoma cruzi, el cual es el patógeno más común asociado con las enfermedades inflamatorias del corazón en pacientes con la enfermedad de Chagas¹⁵. Otras causas de oclusión coronaria son la arteritis necrosante, la poliarteritis nodosa¹⁶ y el lupus eritematoso generalizado¹⁷.

La magnitud y localización del IAM depende de diferentes factores :

- 1.- Localización y gravedad del proceso aterosclerótico en la circulación colateral,
- 2.- Tamaño del lecho vascular perfundido por la coronaria afectada, 3.- Requerimientos de oxígeno del miocardio hipoperfundido, 4.- Grado de desarrollo de la circulación coronaria colateral y 5.- Presencia, localización y gravedad de un espasmo coronario.

Los infartos del miocardio pueden dividirse en dos grupos fundamentales: infartos transmurales, donde la necrosis afecta a todo el espesor de la pared ventricular e infartos no transmurales o subendocárdicos. En la trombosis coronaria aguda parece ser mucho más frecuente el infarto transmural^{18,19}.

Electrocardiográficamente un infarto miocárdico puede ocurrir sin que se presente una onda Q anormal al cual se denomina infarto sin onda Q tratándose siempre de un infarto subendocárdico o infarto sin onda Q. Sin embargo, la correlación entre datos electrocardiográficos de infartos miocárdicos transmurales o subendocárdicos y los datos anatomopatológicos no es muy buena^{20,21}.

La mortalidad de pacientes con infarto sin onda Q es aproximadamente la mitad a la de los pacientes con infarto que presentan electrocardiográficamente una onda Q alterada^{22,23,24} a menos que ocurra una extensión del mismo, un reinfarto, en cuyo caso el porcentaje de mortalidad es similar a la de los pacientes con IM con onda Q²². Los pacientes con infarto sin onda Q tienden a presentar pequeños infartos al inicio y es raro que lleguen a presentar oclusiones completas de las arterias^{19,24}. Sin embargo, no se sabe si un infarto sin onda Q sin complicaciones sea en verdad un proceso patológico benigno^{20,25-28}.

Un estudio demostró que el 60% de los pacientes presentaron obstrucción crítica en arterias coronarias importantes y cerca del 20% llegaron a desarrollar un infarto agudo con onda Q a los 3 meses de haber presentado infarto sin onda Q²⁹. Otro análisis reveló que casi la mitad de los pacientes con infarto sin onda Q sufrieron una angina de pecho inestable durante un período de seguimiento en promedio de 11 meses. En definitiva, es evidente que los pacientes con infartos sin onda Q presentan una historia natural diferente de pacientes con infartos con

onda Q. Los primeros se consideran procesos patológicos relativamente inestables que se acompañan de una mortalidad inicial baja pero con un elevado riesgo de infartos tardíos, letales. En la actualidad se sabe que un infarto miocárdico transmural suele deberse a trombosis coronaria, pero la secuencia fisiopatológica precisa del infarto del miocardio a partir de la aterosclerosis coronaria no es bien conocida ^{30,31}.

La rapidez con la que la trombosis se desarrolla y el grado de circulación colateral puede determinar si una oclusión coronaria aguda causa infarto transmural, subendocárdico o nada de infarto ³².

2.4 OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL IAM:

Entre los análisis microscópicos se encuentran los realizados por Bouclard y Majno quienes observaron un patrón ondulatorio de las fibras miocárdicas que aparecen inmediatamente después de iniciado el infarto: esto se debe a una contracción desordenada de las fibras miocárdicas ^{33,34}. Al microscopio de luz es posible identificar bandas de contracción y pequeños espacios entre las fibras miocárdicas, así como un infiltrado de neutrófilos y eritrocitos ^{33,34}. A los 60 minutos de la oclusión coronaria, se observa edema en las fibras miocárdicas con anomalías de las mitocondrias caracterizadas por desorganización interna y alteraciones de las fibrillas. En una isquemia que se presenta de 20 minutos a las 2 horas, los cambios en algunas fibras se vuelven irreversibles y se agravan las lesiones. En el miocardio isquémico, las mitocondrias están edematosas y contienen en su interior depósitos de fosfato de calcio ³⁵.

A las 24 hrs. en las fibras miocárdicas afectadas hay desorganización del citoplasma con pérdida de las bandas estriadas. En la zona de infarto, los capilares miocárdicos se dilatan; hay acumulación de leucocitos, primero en la periferia y luego en la zona de infarto.

En los 3 primeros días, el tejido intersticial se vuelve edematoso, hacia el cuarto día del infarto empieza la eliminación de las fibras necróticas que comienzan en la periferia, luego hay llegada de linfocitos, macrófagos y fibroblastos, que se infiltran en los miocitos. Al octavo día desaparecen las fibras musculares necróticas y al décimo día disminuye el número de leucocitos polimorfonucleares, mientras que aparece por primera vez un tejido granuloso en la periferia del infarto. En el interior del infarto siguen creciendo vasos sanguíneos infiltrándose fibroblastos, mientras que desaparecen las fibras musculares necróticas; esto sucede entre la cuarta y sexta semana después del infarto. Para esta fecha todo el miocardio necrótico ha desaparecido, este proceso continúa junto con el depósito de fibras colágenas en la zona infartada³⁶.

2.5 MECANISMOS DE CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN MUSCULAR :

Las fibras cardiacas están conectadas entre si mediante una red delgada de filamentos de colágena, estos desempeñan un papel importante³⁷ en la orientación de las mismas, la distensibilidad de tejido y la transmisión de fuerza entre ellas, las fibras elásticas están compuestas de microfilamentos de glucoproteínas y elastina amorfa³⁸. Las fibras del marcapaso o del automatismo cardíaco, son ligeramente más pequeñas³⁹.

El sarcolema es una membrana externa que rodea a cada fibra miocárdica y presenta invaginaciones a lo largo de las líneas Z de los sarcómeros^{37,40,41,42}. El sarcolema está compuesto por la membrana plasmática (plasmalema) y una membrana basal, la primera tiene

la estructura general de doble membrana, mientras que la segunda se encuentra en la superficie externa del plasmalema y consiste en una delgada capa rica en polisacáridos. La función principal de la membrana plasmática en la contracción muscular es la conducción de la onda de despolarización, además de proteger a la fibra muscular, el sarcolema imparte una característica de resistencia al estiramiento del músculo.

El sarcoplasma de una fibra muscular consiste en el contenido del sarcolema, con exclusión de las proteínas de los elementos contráctiles y los núcleos. Contiene los organelos citoplasmáticos usuales, incluyendo las mitocondrias y retículo endoplásmico.

Los miocitos (fibras miocárdicas) normalmente presentan una longitud de 50 a 100 micrómetros y un diámetro de 10 a 25 micrómetros. Cada fibra está formada por numerosas fibrillas estriadas dispuestas en sentido longitudinal, las cuales, a diferencia de lo que sucede en el músculo esquelético, están parcialmente separadas por inclusiones citoplasmáticas que contienen mitocondrias y túbulos ^{39,40}.

Las fibras están compuestas por sarcómeros iguales, dispuestos longitudinalmente y separadas por dos líneas ³⁹. Los sarcómeros ocupan cerca del 50% de la masa de las fibras cardíacas ⁴³ y se ordenan de manera que los extremos de las fibrillas adyacentes están alineadas, obteniéndose así una imagen estriada ^{40,44}. Los sarcómeros varían entre 1.6 y 2.2 micras, según la longitud del músculo. El centro del sarcómero está ocupado por una banda oscura, la banda A (banda anisotrópica o birrefringente que rota la luz polarizada) y tiene una longitud de 1.5 micras. La banda A está limitada por dos bandas más delgadas denominadas bandas I (isotrópicas) de longitud variable en función de la longitud del sarcómero. Las bandas del sarcómero reflejan la superposición de los filamentos constituidos por proteínas contráctiles.

Los filamentos delgados de actina están unidos a cada línea Z y se proyectan en sentido longitudinal hacia el centro del sarcómero, en donde se superponen con los filamentos gruesos compuestos de moléculas de miosina^{39,41,44}. Los filamentos gruesos y delgados en la banda A generan la fuerza y el acortamiento del miocardio, ya que los filamentos se deslizan uno sobre otro conservando constante su longitud. El núcleo está colocado en el centro de las fibras miocárdicas.

Las mitocondrias que constituyen el 20% del volumen de las fibras⁴³ son estructuras elípticas de aproximadamente 2 a 5 micras por 0.5 micras y están situadas entre y junto a las fibrillas, y también debajo del sarcómero³⁹; presentan repliegues o crestas que se proyectan hacia el centro de su membrana superficial y contienen enzimas del ciclo del ácido tricarbónico. La gran proximidad de las mitocondrias, en donde se produce ATP, a los filamentos contráctiles, facilita la transferencia de ATP de su lugar de producción a los lugares de su utilización durante el proceso contráctil.

La capacidad de contracción del músculo y con ello de realizar trabajo mecánico, está relacionada con: la existencia de elementos estructurales específicos y la disponibilidad de la energía química que se transforma en energía mecánica durante el proceso de contracción. Los verdaderos elementos contráctiles capaces de estirarse de forma reversible son las miofibrillas, que constan de filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina que se encuentran superpuestos, con una longitud constante, tanto en reposo como durante la contracción^{40,45,46}.

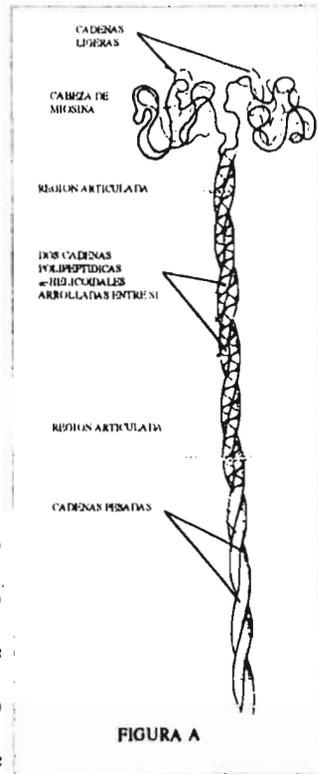
2.6 PROTEÍNAS DE LOS ELEMENTOS CONTRÁCTILES :

La estructura de las proteínas es compleja, la adaptación de la célula para poder realizar un número extraordinario de reacciones químicas es una función principal de las proteínas, las cuales pueden transferir grupos químicos de un compuesto a otro, funcionalmente pueden proporcionar rigidez a la célula, controlar el flujo en el transporte de metabolitos, actuar como sensores para encender genes, producir movimiento, etc. Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes. Se encuentran en todas las partes de cada célula ya que son la parte estructural y funcional de la misma. Existen muchas clases de proteínas cada una de ellas especializada en una función biológica diferente, todas contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Los pesos moleculares de las proteínas son muy elevados, pero por hidrólisis ácida, las moléculas protéicas dan una serie de compuestos orgánicos sencillos de bajo peso molecular, que son los aminoácidos, que están enlazados por uniones amida llamándose enlaces peptídicos. Los filamentos gruesos y finos están constituidos principalmente por proteínas de miosina y actina, respectivamente.

2.6.1 MIOSINA :

La miosina es una proteína presente en todas las células eucarióticas, inicialmente, se descubrió por su actividad motora en el músculo, posteriormente, se encontró en células no musculares y hasta la fecha se ha caracterizado ampliamente, se dice que es una enzima única porque puede moverse a lo largo de un filamento de actina por acoplamiento a cambios conformacionales por la hidrólisis de la molécula de ATP.

Los filamentos cardiacos más gruesos, están compuestos de moléculas de miosina, esta proteína sólo se encuentra en la banda A, tienen un diámetro aproximado de 150 nm con extremos afilados, mide entre 1.5 a 1.6 micras de longitud^{40,47} y tiene un peso molecular de 460 Kd (fig.A); y los filamentos se



conservan paralelos y ordenados entre si por el efecto de conexiones centrales de la línea M. Cada molécula de miosina presenta una cola en forma de bastón que está formada por 2 cadenas polipeptídicas alfa-helicoidales enrolladas entre sí, llamadas cadenas pesadas de aproximadamente 1300 nm de longitud cada una; y una cabeza en forma de dos estructuras esféricas formadas por 4 cadenas polipeptídicas (2 cadenas de 18 Kd, 1 de 16 Kd y 1 de 21 Kd) que forman las cadenas ligeras, con una separación de 14.3 nm entre cada una de las estructuras. Existen 50 de estos conjuntos en cada mitad del filamento grueso, que rotan,

cuando se activa el músculo, forman uniones o puentes con los filamentos de actina ^{48,49} generando fuerza y produciendo acortamiento de las fibras. La miosina por si sola es capaz de disociar el ATP, ya que la cabeza globular de la miosina tiene actividad enzimática (ATPasa) que se inhibe por el Mg^{+2} y se activa con pequeñas cantidades de Ca^{+2} ⁵⁰. Cuando la miosina se combina con la actina, se forma un complejo de actomiosina que posee una actividad enzimática todavía mayor para utilizar ATP y que se estimula fundamentalmente por Mg^{+2} . Mediante la tripsina, una enzima proteolítica, la molécula de miosina se separa en dos fragmentos: la meromiosina ligera y la meromiosina pesada; la meromiosina pesada a su vez puede separarse en dos porciones, fragmento S_1 y otro fragmento S_2 , formando las porciones que contienen la actividad enzimática ATPasa.

2.6.2 ACTINA :

La locomoción de la célula resulta de la coordinación de varias partes celulares como el citoesqueleto, constituido por varias proteínas entre ellas la actina cuya organización es la forma más básica que se encuentra en la célula, esta proteína se reorganiza por subunidades helicoidales formando filamentos. Los filamentos delgados compuestos por actina los cuales integran las miofibrillas cardiacas tienen una longitud de 1.0 micras en fibra ventricular, estas fibras forman una doble hélice que consta de dos cadenas de actina con peso molecular de 47 Kd y un diámetro de 55 nm ⁵¹.

Los filamentos de actina se extienden desde la línea Z del sarcómero a través de la banda I hasta llegar a la banda A, en esta última banda se localiza la región donde se superponen los filamentos gruesos y delgados. en tanto que la banda I sólo contienen filamentos delgados.

2.6.3 TROPONINA Y TROPOMIOSINA :

Constituyen cerca del 10% del total de las proteínas de las fibrillas y se relacionan con el filamento delgado³⁸.

La tropomiosina es una proteína en forma de bastón, de 400 nm de longitud y de 20 a 30 nm de diámetro, con un peso molecular de 700 Kd⁴⁶. Presenta la forma de dos espirales, cada una de las cuales se sitúa cerca del centro del surco entre las cadenas de actina. La tropomiosina forma una cadena continua a través de la porción central del filamento de actina, mientras que el complejo troponina se localiza a intervalos de 365 nm.

La troponina puede separarse en tres componentes⁵²: troponina C "factor excitador de calcio", que se une al calcio, troponina I "factor inhibidor" de la ATPasa de la actomiosina estimulada por el Mg⁺² y troponina T, necesaria para que funcione todo el complejo de la troponina, y sirve para que el complejo de la troponina se una a la actina y la tropomiosina^{53,54}.

Cuando faltan estas proteínas reguladoras de la contracción, las proteínas contráctiles actina y miosina interactúan y se activan por completo; para ello, sólo se necesita la presencia de Mg⁺² y ATP para iniciar la reacción que lleva a la contracción muscular. Sin embargo, en presencia de troponina y tropomiosina se inhibe la formación de puentes cruzados entre la miosina y actina⁵⁵. Cuando el Ca⁺² se une a la troponina C, se inhibe la unión de la troponina I con la actina, la cual a su vez produce un cambio en la formación de la tropomiosina. La inhibición de la interacción entre la actina y miosina, altera la configuración de la tropomiosina, la cual a su vez modifica la disposición de los sitios activos a lo largo del filamento de actina durante la relajación. La tropomiosina bloquea los sitios activos de la actina que actúan para formar puentes transversales con la miosina^{54,56}. Al producirse la despolarización celular, el Ca⁺²

intracelular aumenta de 10^{-7} hasta cerca de 10^{-5} M. La troponina liga el Ca^{+2} y los bastones de actina se desplazan hacia el centro del sarcómero ⁴⁹. Una vez efectuado este primer paso, una cabeza de la miosina unida a la actina expulsa sus productos de hidrólisis del ATP, se une a otra molécula de ATP y se despega del sitio de unión con la actina, luego la cabeza de actina vuelve a tomar su orientación original y el ciclo se repite: la cabeza de miosina se une a un monómero diferente de actina en un sitio más distante en el filamento de actina ^{52,57}.

Por lo tanto el proceso de acortamiento del músculo cardíaco consiste en un cambio relativo en la posición de los dos filamentos contráctiles; es decir, los filamentos de actina se deslizan sobre los de miosina por un proceso en el cual se produce fuerza de muchos puentes transversales ⁵⁸. Si al músculo no se le permite acortarse, es decir, se produce una contracción esométrica (en presencia de Ca^{+2}), la meromiosina pesada no sufre ningún cambio conformacional, se conservan los puentes entre actina y miosina es el ADP en vez del ATP el que permanece unido a la miosina ⁴⁹. La fuerza desarrollada es proporcional a la cantidad de Ca^{+2} unido a la troponina C, la cual a su vez se relaciona con el Ca^{+2} intracelular ⁵⁹. En la cabeza de la miosina las proteínas más pequeñas, llamadas "cadenas ligeras" experimentan fosforilación produciendo cambios no bien precisados en la actividad enzimática de la misma ⁴⁹. Se ha dicho que la actividad de la ATPasa de la actomiosina aumenta al incrementar el monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) en el interior de las fibras ^{60,61} que es un probable mecanismo por el cual la estimulación beta-adrenérgica ejerce un efecto inotrópico positivo.

2.7 TRATAMIENTO EMPLEADO EN EL IAM :

Antes del advenimiento de las unidades de cuidados coronarios, el tratamiento del IAM se enfocaba casi exclusivamente hacia la cicatrización del infarto, prevención de la ruptura cardíaca, complicaciones como embolia pulmonar o arterial, y a conservar la presión arterial y la diuresis. Posteriormente la monitorización cuidadosa del ritmo cardíaco y el tratamiento rápido de arritmias primarias permitieron reducir notablemente la frecuencia de la mortalidad hospitalaria por IAM ⁶².

El decremento en la mortalidad de la enfermedad coronaria se acompaña de una reducción en los fallecimientos por IAM, al parecer esto se debe a dos factores: disminución del 25% o más en la frecuencia de IAM ⁶³ y un descenso igual de importante en la mortalidad una vez que ha ocurrido el infarto ⁶⁴⁻⁶⁶. Las razones de este efecto ha sido motivo de grandes discusiones ^{67,68}. Según estudios recientes ^{69,70} cerca del 40% de la disminución en la mortalidad se debe a: unidades de cuidados coronarios, reanimación prehospitalaria y nuevos tratamientos mecánicos y médicos de la enfermedad coronaria.

Todos los pacientes con datos de isquemia recurrente después de un infarto (sin importar localización o morfología del IM determinado por ECG) deben someterse a tratamiento médico; reposo en cama, oxígeno, y administración de fármacos, éstos pueden ser: vasodilatadores nitrados (nitroglicerina), vasodilatadores no nitrados (meperidina), antagonistas del calcio (nifedipina) o bloqueadores-adrenérgicos; y en caso necesario hay que considerar la posibilidad de revascularización coronaria. Sin embargo, es muy importante seguir de manera cuidadosa a los pacientes sintomáticos con infartos sin onda Q, debido a la presencia frecuente de miocardio isquémico pero viables en tales pacientes.

Algunos estudios realizados durante 1984-1985 demostraron que los beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol) administrados por vía intravenosa aumentan el tiempo de vida en los pacientes afectados de infarto agudo al miocardio y no tratados con sustancias trombolíticas¹⁰.

En otro estudio con 500 pacientes a los cuales se les administró un antagonista del calcio (diltiacem), se encontró una disminución del 50% en la frecuencia del padecimiento, no hay datos firmes de que esta estrategia afecte de manera favorable la evolución del IAM⁷¹.

Por otra parte entre los primeros fibrinolíticos que se emplearon fueron la estreptocinasa (SK), y urocinasa (UK, uPA), estas sustancias tienen el inconveniente de ser poco específicas para la fibrina; es decir activan el plasminógeno que circula en la sangre y el que está asociado al trombo, la plasmina provoca de esta manera la degradación de la fibrina y del fibrinógeno circulante (fibrinólisis sistémica) y otras proteínas que intervienen en la coagulación como factor V y VIII.

En los últimos años se han empleado medicamentos de segunda generación capaces de activar preferentemente el plasminógeno vinculado a la fibrina de los trombos. Se trata de un activador tisular del plasminógeno (t-PA o alteplasa, la pro-urocinasa Pro-UK o scu-PA), este compuesto se ha producido a partir de ingeniería genética bajo el nombre de rt-PA (t-PA recombinante) y se comercializa bajo el nombre de Actilyse, no provoca la formación de anticuerpos ni alergias. Todos los trombolíticos ensayados en estudios a gran escala producen una mejoría clara en la supervivencia de los pacientes después del IAM.

Los primeros términos de reperfusión (repermeabilización) coronaria eran la cirugía y la angioplastia coronaria. En 1983 R.B. Jennings y K.A. Reimer de Durham, E.U. demostraron

experimentalmente que la reperfusión coronaria reduce el tamaño de la zona del miocardio lesionado e impide que el miocardio isquémico se necrose.

Estudios cooperativos europeos demostraron que el t-PA produce una reperfusión más rápida y más frecuente de las arterias coronarias ocluidas³.

2.8 DIAGNÓSTICO DEL IAM :

La realización del diagnóstico del IAM se apoya en varios análisis, los cuales van desde el análisis clínico, el cual comprende el interrogatorio y exploración física del paciente, así como: electrocardiografía, ecocardiografía, angiocardiógrafa, biopsias, análisis de laboratorio (determinación de enzimas) y medicina nuclear.

La electrocardiografía, es un registro gráfico de las corrientes eléctricas producidas durante la contracción del músculo cardíaco; los diversos potenciales de acción producen un cuadro demostrativo de la actividad cardíaca, la ecocardiografía es una prueba en la que se utiliza el ultrasonido para examinar y registrar el corazón, en forma de ecos, esto es reflejo de las ondas sonoras, que dan a conocer la funcionalidad del mismo, la angiocardiógrafa, es la utilización de los rayos X para obtener imágenes de las cavidades del corazón y los grandes vasos con la inyección intracardiaca de una sustancia opaca a los rayos X. Por muchos años la coronariografía no se practicaba en la fase aguda del IAM por temor a sus complicaciones^{72,73}. Sin embargo, por la experiencia en el último decenio, se ha observado que la angiografía es un método inocuo aún durante la fase aguda del IAM⁷⁴.

La coronariografía llevada a cabo en las primeras horas de un infarto miocárdico transmural ha mostrado que en el 90% de los pacientes existe una oclusión total del vaso sanguíneo relacionado con la zona del infarto^{74,75}. La oclusión de una arteria coronaria ligada a la zona

de infarto miocárdico parece la vía final común debida a la interacción compleja y dinámica entre aterosclerosis coronaria, vasospasmo y activación de las plaquetas que al final producen una trombosis coronaria ^{30,76,77}.

Y finalmente la biopsia es otro método por medio del cual se puede determinar la naturaleza de la lesión patológica, es un examen microscópico de un fragmento de tejido lesionado.

Un problema importante que confrontan los cardiólogos es el funcionamiento de biopsias endomiocárdicas en la sospecha de pacientes con miocarditis. El argumento contra las biopsias por la baja incidencia de miocarditis, la percepción de un pronóstico bueno y el riesgo de la biopsia. La decisión de tomar una biopsia es de alto peso contra los procesos de riesgo, el 2% de los estudios prospectivos muestran un riesgo al realizar la biopsia en pacientes con dilatación cardiopática ^{62,63,78}.

Las conclusiones derivadas de estudios de necropsias de las arterias coronarias después de un IAM presentan limitaciones debidas a la selección, de la muestra y por los episodios que suceden después de la muerte ^{72,73}.

En presencia de una lesión de las fibras miocárdicas, en el torrente circulatorio se liberan varias enzimas que pueden medirse mediante reacciones químicas específicas ⁷⁹. En el suero o plasma de pacientes con IAM se ha encontrado un aumento de la actividad enzimática ^{80,81}. La determinación de la actividad plasmática de la creatinincinasa (CK), de la transferasa glutámico oxalo acética (TGO) y la deshidrogenasa láctica (DHL) se han vuelto pruebas de laboratorio ordinarias en el diagnóstico del IAM.

Creatincinasa (CK): la actividad plasmática de la creatincinasa aumenta entre las 4 y 8 horas después del comienzo del infarto del miocardio ⁷⁹. La elevación máxima de la actividad de la CK en el IAM varía de modo importante ya que se puede alcanzar a las 8 horas después del comienzo del dolor o hasta unas 58 horas después del infarto ⁸². Si bien la elevación máxima de la CK en el IAM suele ocurrir a las 24 horas del infarto, los valores máximos ocurren antes en pacientes que presentan una reperfusión por la administración de un tratamiento trombolítico o por una canalización mecánica, ya que la elevación máxima de CK ocurre a las 12 horas del infarto en tales pacientes ^{80,83}.

El aumento de la CK plasmática es la prueba de laboratorio más sensible para el diagnóstico de infarto miocárdico que se emplea de manera ordinaria ^{79,84-87}, pero hay que recordar que dicho aumento se observa también en 15% de pacientes con enfermedades musculares, intoxicación alcohólica, diabetes sacarina y en caso de embolia pulmonar ^{80,84-88}.

Mediante electroforesis se han identificado tres isoenzimas de CK (MM, BB y MB). El corazón contiene la forma MB, los músculos esqueléticos MM y el cerebro y riñón BB. El ejercicio violento, en corredores o en atletas profesionales, también puede elevar los niveles tanto de CK total como de CK-MB ^{89,90}. Datos recientes indican la posibilidad de que la producción de las isoenzimas es, por lo menos en parte, de tipo dinámico, ya que la porción relativa de isoenzimas MB en el músculo cardíaco depende quizá de maduración, una enfermedad coronaria preexistente o de hipertrofia ventricular izquierda ⁸². No obstante estos problemas y el hecho que existen pequeñas cantidades de la isoenzima CK-MB en otros tejidos que no son el corazón, un aumento de la actividad plasmática de CK-MB puede considerarse como diagnóstico de IAM. La medición de las isoenzima CK-MB en el suero

sigue siendo el análisis más útil y la que más se usa para el diagnóstico de necrosis miocárdica^{80,91,92,93}. El perfeccionamiento del método de radioinmunoanálisis para medir la actividad plasmática de la CK-MB ha sido de gran utilidad para incrementar la precisión, sensibilidad y especificidad de esta prueba⁹⁴. Además del IAM y obstrucción coronaria, otras lesiones del músculo cardíaco como miocarditis, traumatismo, estado de choque⁹⁴ o cirugía cardíaca, también producen aumento de la actividad plasmática de CK-MB⁹⁵.

Clinicamente todas estas alteraciones que provocan dicho aumento son muy fáciles de distinguir de un diagnóstico de IAM.

En cerca del 15% de pacientes con la sospecha de un IAM, la CK-MB está elevada a pesar de una CK total normal⁹¹.

La actividad de la TGO del suero suele aumentar entre 8 y 12 horas después del comienzo del dolor precordial que acompaña a un infarto; las cifras máximas de TGO ocurren entre las 18 y 36 horas posteriores al infarto. Se han encontrado elevaciones falsas positivas de esta enzima en pacientes con enfermedades hepáticas, congestión hepática, enfermedades de los músculos esqueléticos, embolia pulmonar y choque cardiogénico⁷⁹. Concentraciones elevadas de TGO también se observan en pacientes con pericarditis.

La *deshidrogenasa láctica* (DHL) en suero aumenta entre 24 y 28 horas después del comienzo del infarto del miocardio, alcanza su máximo entre 3 y 6 días siguientes del infarto. Al igual que la TGO, la DHL total es una prueba sensible pero no específica; una elevación falsa positiva ocurre en pacientes con hemólisis, anemia megaloblástica, leucemia, enfermedades hepáticas, congestión del hígado, enfermedades renales, embolia pulmonar y por estado de choque^{79,80}. La mayoría de las circunstancias que causan aumento en la actividad

plasmática total de DHL, como sucede en enfermedades hepáticas, y en padecimientos o lesiones de los músculos esqueléticos son fáciles de distinguir de un IAM con sólo analizar las isoenzimas de DHL. El examen de DHL o de sus isoenzimas para diagnóstico de IAM hay que limitarlo a los casos en que los resultados de CK caen dentro de límites normales, esto es, cuando se sospecha que el infarto ha ocurrido entre 2 y 4 días precedentes.

Entre los métodos empleados más recientemente para el diagnóstico del IAM se encuentra la gammagrafía con radiofosfatos el cual utiliza el ácido difosfano-propano-dicarboxílico marcado con Tc^{99m} (DPD Tc^{99m}), éste compuesto tienen gran afinidad por el calcio, así cuando la célula se necrosa el calcio que se encuentra en las mitocondrias puede reaccionar con el radiofosfato, el cual se detecta por una gammagrafía.

Igualmente ha sido de gran utilidad la gammagrafía con anticuerpos monoclonales anti-miosina marcados con Iu^{111} , ya que éstos reaccionan con la miosina de las células lesionadas al quedar alterada la permeabilidad de la membrana y permitir el paso de los mismos. Se administran por vía intravenosa y no han producido ninguna reacción alérgica ni otros efectos indeseables.

Este método de diagnóstico puede ser altamente específico ya que se realiza una reacción antígeno-anticuerpo, por lo que el empleo de ésta tecnología permite la detección y localización del daño al miocardio en la parte inferoposterior del corazón. En estudios donde se comparan las biopsias endomiocárdicas con los registros anti-miosina (imágenes anti-miosina) tienen una sensibilidad de 83%, una especificidad de 53% y un valor de predicción de 92%. En áreas donde las biopsias endomiocárdicas no son valiables, los registros con anti-miosina pueden ser una herramienta para ver pacientes con subsecuentes procesos invasivos⁹⁸.

En un estudio se comprobó la eficacia de las gammagrafías cardíacas con radiofosfatos y con anticuerpos monoclonales anti-miosina, para lo cual se utilizó ácido difosfano-propano-dicarboxílico marcado con Tc^{99m} (DPD Tc^{99m}) y anticuerpos monoclonales R11 D10 Fab anti-miosina marcados con In^{111} (AAM In^{111}) se utilizaron imágenes planares con DPD Tc^{99m} y estudios tomográficos (SPECT). La gammagrafía con DPD Tc^{99m} fue positiva en 44% de los casos y de 52% para el caso de la técnica con anticuerpos monoclonales anti-miosina AAM In^{111} (n=48). La mayor parte de los infartos se localizaron en la zona inferoposterior del corazón. En pacientes con sospecha de IAM sin onda Q esta exploración podría ser de gran utilidad, no sólo para confirmar el diagnóstico sino para la localización de la necrosis. El 12% de los infartos detectados con AAM In^{111} eran de localización anterior y el 88% inferoposterior. Con DPD Tc^{99m} el 14% de las exploraciones positivas mostraron captación en la zona anterior del corazón y el 86% en la zona inferoposterior³.

Es importante en la zona isquémica el tiempo que transcurre después de la oclusión en el corazón, para la recuperación del tejido ya que la reperfusión no es seguida de la recuperación inmediata. Si a los 15 minutos, después de la oclusión se realiza una reperfusión se puede salvar el 100% de la zona isquémica, si la oclusión se sostiene por 40 minutos se salvará el 70% y permanecerá el 30% del tejido necrótico de forma irreversible y finalmente si la isquemia es total permanece de 3-6 horas se salvará sólo el 10% del área afectada⁹⁶.

En otro estudio fueron desarrollados experimentalmente en unión selectiva e irreversible en miocitos dañados anticuerpos monoclonales anti-miosina murina. La intensidad de la anti-miosina está en correlación con la localización del infarto. De 50 pacientes, 46 resultaron positivos con ECG y 44 con anti-miosina. La localización por ECG fue anterolateral (n=20) o

inferoposterior (n=30). Con la alta intensidad de las imágenes anti-miosina la localización fue inferoposterior ⁹⁷.

Recientemente un alto dominio de anti-miosina, ha sido reportada en pacientes con dilatación cardiopática. Se estudiaron los anticuerpos monoclonales anti-miosina marcados con In ¹²⁵, In ¹³¹ en miocarditis experimental en ratones BALB/c inducida por el virus de encefalomiocarditis (EMC). La distribución de los anticuerpos marcados con In ¹²⁵ demostraron que el alto rango de radioactividad aparece en el corazón del ratón infectado en 14 días ⁹⁸.

Los fragmentos Fab anti-miosina no sólo han sido marcados con In ¹¹¹ sino también con Tc ^{99m} con la finalidad de ser utilizados para la examinación por medio de imágenes nucleares en pacientes con IAM. Las imágenes anti-miosina se registran por scintigrafía planar y SPECT, delimitando las áreas de necrosis miocárdica y comparándolas con imágenes utilizando pirofosfatos marcados con Tc ^{99m}. Los resultados desarrollan una correlación significativa.

Este método de diagnóstico está en función del flujo sanguíneo y la concentración del anticuerpo en la zona del infarto ¹⁰³.

Antes de la administración de los anticuerpos se realizó una prueba de sensibilidad vía intradérmica con 0.1 ml del anticuerpo monoclonal anti-miosina marcado con Tc ^{99m} observándose por 15 a 30 minutos, en espera de una reacción alérgica.

Se administró vía intravenosa 500 µl de los anticuerpos monoclonales anti-miosina marcados con 15-25 mCi de Tc ^{99m}, observándose de 6-24 hrs. después de la inyección. La localización

de los anticuerpos anti-miosina radiomarcados correspondiendo a la región exacta delimitada histoquímicamente con infarto al miocardio ^{104,105}. Este método de diagnóstico con imágenes anti-miosina es comparado con los análisis de laboratorio para la detección de la enzima CK ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Con las imágenes obtenidas la localización del infarto resultó ser anterior o infero posterior presentándose una correlación con los datos obtenidos en el ECG. La miocarditis ocasionalmente enmascarada con IAM se ha presentado en pacientes que desarrollaron severo dolor de pecho, cambios en el ECG y elevación de la CK en el suero. Dichos pacientes presentaron arterias coronarias normales, quienes presumiblemente murieron de IAM, pero que se les había diagnosticado miocarditis, la cual fue reportada como una anomalía incidental en la autopsia ⁹⁹⁻¹⁰².

2.9 MIOCARDITIS :

La miocarditis es ocasionalmente enmascarada con el IAM, esto debido a que la sintomatología clínica es similar al que se presenta en el IAM: dolor precordial, cambios del segmento ST y de la onda T en los electrocardiogramas, elevación de la concentración de la CK en el suero y se acompaña de síntomas inespecíficos, que incluyen fatiga, disnea y palpitaciones ¹⁰⁹. Safir y Wile fueron los primeros en describir histológicamente la miocarditis como infiltración de linfocitos en miocitos necrosados en el miocardio ¹¹⁰

Se dice que se presenta una miocarditis cuando el corazón es afectado por cualquier proceso inflamatorio, debido a un agente infeccioso, éste puede ser un virus, bacteria o protozooario.

Los agentes infecciosos pueden causar daño por 3 mecanismos: invasión del miocardio, producción de toxinas miocárdicas y daño miocárdico mediado inmunológicamente ¹⁰⁹.

El enterovirus Coxsackie B de la familia Picomaviridae, es el responsable de la mayoría de las apariciones virales de miocarditis . Otros agentes infecciosos que también pueden causar esta patología son: el Coxsackie A , el Echovirus y el virus de la polio ¹¹¹.

Existe dificultad en la confirmación del diagnóstico de miocarditis ya que se tiene que demostrar la presencia de partículas virales en el tejido humano lo que conlleva a la realización de una biopsia.

La habilidad para reconocer miocarditis en pacientes que inicialmente se les diagnosticó IAM, se basa en las imágenes planares con anticuerpos monoclonales anti-miosina marcada con In¹¹¹, en donde las imágenes se observan difusas en el miocardio; mientras que en el IAM se observan las imágenes localizadas ¹¹².

Desde la asociación de miocitos necrosados con miocarditis, casi todos los pacientes que desarrollaron miocarditis evaluados por biopsia resultaron tener un análisis anormal en un estudio con los anticuerpos anti-miosina ¹¹³.

En muchos casos el diagnóstico no definitivo fue buscado, después que los pacientes resultaron tener arterias coronarias normales y debido a que la miocarditis rara vez está documentada durante la vida por biopsias endomiocárdicas ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

El reconocimiento de la miocarditis en pacientes que presumían tener IAM, pudo valorarse porque la función ventricular anormal se resuelve generalmente en pacientes con miocarditis. De 1984 a 1991 164 pacientes que ingresaron a una Institución con sospecha de miocarditis ¹¹⁶⁻¹¹⁸, se evaluaron con imágenes anti-miosina y biopsias ventriculares izquierdas. La revisión de la presentación clínica reveló que 8 pacientes fueron admitidos en la unidad de cuidados coronarios, inicialmente se les diagnosticó isquemia; basándose en un prolongado

dolor de pecho y anomalías en ECG; en estos pacientes se les encontraron arterias coronarias normales y posteriormente se sospechó de miocarditis.

El análisis de las imágenes con anticuerpos anti-miosina de estos pacientes fue comparado con las imágenes de pacientes con IAM y angiografías con evidencia de una oclusión coronaria.

La metodología de los anticuerpos anti-miosina por su alta sensibilidad y el alto valor de predicción pueden servir para seleccionar pacientes con sospecha de miocarditis. Los miocitos necrosados asociados a este padecimiento tienen un patrón diferente al de los miocitos necrosados asociados a IAM. Las imágenes nucleares con anticuerpos anti-miosina para miocarditis son usualmente caracterizadas por ser difusas, borrosas y heterogéneas; debido a que esta enfermedad es típicamente multifocal. El IAM está caracterizado por la intensa localización de los anticuerpos en la región de la oclusión coronaria. Aunque las biopsias endomiocárdicas son un proceso estándar para el diagnóstico de miocarditis, los resultados aquí obtenidos demuestran que el análisis con anticuerpos anti-miosina puede ser útil en pacientes con presumible sospecha de IAM pero con arterias coronarias normales¹².

3 OBJETIVO

El objetivo principal del presente trabajo es el establecimiento de la metodología para la obtención de anticuerpos policlonales anti-miosina cardiaca canina preeliminar a la obtención de anticuerpos monoclonales anti-miosina para ser utilizados como método de diagnóstico.

Los objetivos particulares a seguir son:

- 1.- Establecimiento de una metodología para la extracción de la miosina cardiaca canina
- 2.- Purificación de miosina empleando 3 técnicas comparativas
 - A.- Precipitación con sulfato de amonio,
 - B.- Electroelución ,
 - C.- Electroforesis por punto isoelectrico
- 3.- Inmunización de ratones para la producción de anticuerpos policlonales anti-miosina
- 4.- Monitoreo del titulos de los anticuerpos policlonales anti-miosina por medio de las técnicas de INMUNOPUNTO y ELISA.
- 5.- Comprobación por método inmunohistoquímico si los anticuerpos policlonales anti-miosina obtenidos reconocen la miosina de tejido humano necrosado.

4 MATERIALES Y MÉTODO

4.1 EXTRACCIÓN DE MIOSINA CARDIACA CANINA :

La miosina fue extraída de corazón canino dado a que el objetivo principal fue el establecimiento de la metodología para la obtención de anticuerpos policlonales anti-miosina cardiaca canina y esta posteriormente pueda usarse en el aislamiento de miosina a partir de muestras de tejido cardiaco humano, pues la obtención de este tejido en ocasiones es complicada

La miosina fue extraída de corazón canino siguiendo la metodología de Mukhallad A. y col.¹¹⁹, se partió de 8.52 gr de tejido canino cardiaco sin epitelio, el cual se cortó en fragmentos pequeños y a continuación se homogenizó en un politrón a 4°C por 15 minutos con aproximadamente 100 ml de solución 1 (ver apéndice), [50 mM de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4), 1 mM de etilenglicol-bis(beta-amino-etil eter)N,N'-tetra-acetato de potasio ($\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$), 0.125 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), pH de la solución 7], este homogenizado se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C por 20 minutos.

Con la solución 1 se pretende eliminar las proteínas hidrofílicas presentes en el tejido, obteniéndose en el precipitado preferentemente la miosina.

Posteriormente el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido con una solución 2 (ver apéndice) [150 mM de fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), 300 mM de cloruro de sodio (NaCl), 10 mM de adenosil-trifosfato de sodio (Na_2ATP), 1mM de $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$, 0.125 mM de (PMSF) y 1 mM de 2-mercapto etanol el pH de la solución 6.7]. Posteriormente se

centrifugó nuevamente a 10 000 rpm a 4°C por 20 minutos, obteniéndose así en el sobrenadante la miosina que denominamos miosina nativa.

La miosina nativa fue analizada cualitativamente por electroforesis en geles de poliacrilamida según el método de Laemmli ¹²⁰, la concentración de acrilamida fue de 7.5% puesto que la miosina es una proteína de 460 Kd, la muestra fue tratada de forma convencional. Se hicieron tinciones con azul de Coomassie inicialmente y posteriormente con tinción de plata, debido a que con ésta última técnica se obtiene una mayor sensibilidad.

Para comprobar que la proteína extraída era miosina se realizó una técnica de inmunopunto ¹²¹ con 10 µl de extracto proteínico, se bloqueó con albúmina bovina al 0.5% y se utilizaron anticuerpos anti-miosina de músculo liso y esquelético desarrollados en conejo, marca Sigma.

4.2 PURIFICACIÓN DE LA MIOSINA CARDIACA CANINA :

De la extracción de miosina nativa obtenida, la purificación se realizó empleando 3 técnicas comparativas de purificación las cuales fueron:

A.- Precipitación con sulfato de amonio,

B.- Electroelución ,

C.- Electroforesis por punto isoeléctrico .

A.- La técnica de precipitación ¹²² se realizó por adición a la miosina nativa, de sulfato de amonio 40% a 4°C por 24 horas, concentración a la cual precipita la miosina, posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 10 minutos, el precipitado se resuspendió en una solución de cloruro de potasio (KCl) 0.5M, la miosina es altamente soluble en concentraciones altas de potasio, después se dializó a 4°C contra una solución que contenía fosfato dibásico de

potasio (K_2HPO_4) 0.15M, ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) 10 mM y el pH de la solución fue 7, se hicieron varios cambios para asegurarnos de no tener sulfato de amonio.

La miosina purificada se cuantificó por el método de Bradford ¹²¹ y la pureza se analizó por electroforesis en poliacrilamida ¹²⁰ con tinción de plata ¹²⁴.

B.- Otra técnica de purificación empleada fué la electroelución, se partió de miosina nativa con la que se realizó un gel preparativo de poliacrilamida al 7.5%, posteriormente se identificó la banda de miosina para cortar y montar la muestra en el equipo de electroelución, se corrió por 1 hora 30 minutos, se utilizó una solución de tris(hidroximetil)amino-metano (TRIZMA-BASE) 10 mM y glicina 150 mM.

El fundamento de esta técnica es la extracción de las proteínas presentes en un gel de poliacrilamida por medio de un campo eléctrico y una solución amortiguadora.

Posteriormente las muestras se dializaron contra KCl 0.25M, y se concentraron por liofilización. También fue cuantificada la proteína por método de Bradford ¹²¹ y analizada por electroforesis en poliacrilamida ¹²⁰ y tinción de plata ¹²⁴.

C.- En la purificación de la miosina empleando el punto isoeléctrico se realizó por medio del equipo llamado Rotofor, en el cual mediante anfólicas se forma un gradiente de pH en un soporte líquido. El pH isoeléctrico es el pH a que una proteína muestra un mínimo de solubilidad y está definido como aquel valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico. Dicho isoelectroenfoco fue realizado a partir de 10 ml de miosina nativa, 10 ml de glicerol, 1.5 ml de anfólicas con un rango de pH de 3 a 10, y 35 ml de agua, el tiempo de corrida fue de 3 horas. A las 20 fracciones obtenidas se

les adicionó NaCl y se dializaron contra agua para posteriormente dializar contra KCl 0.5M y contra TRIS 0.005M, se cuantificaron por el método de Bradford ¹²³, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida teñidas con nitrato de plata, así como inmunotransferencia en papel de nitrocelulosa, como fue mencionado anteriormente.

La miosina comercial que fue utilizada en todos los ensayos como referencia, fue miosina de cerdo en solución al 50% conteniendo glicerol 0.6M de KCl, pH= 6.8 2ml; 12.6 mg de proteína/ml de acuerdo al método de Biuret. Actividad ATPasa 0.28 Umg prot. 1 unidad liberada 1.0 micromoles de Pi de ATP/min a pH=9.0 a 25°C en presencia de Ca²⁺.

4.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-MIOSINA :

Una vez extraída y purificada la miosina del corazón canino se prosiguió a comparar las 3 técnicas de purificación empleadas, seleccionando aquella que nos proporcionara mayor concentración y mejor pureza; esta fue la purificación por isoelectroenfoque para proseguir con la obtención de anticuerpos policlonaes anti-miosina. Se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad, utilizándose como se mencionó anteriormente la miosina purificada por la técnica de isoelectroenfoque la cual fue emulsificada con adyuvante incompleto de Freund; se administró por vía intraperitoneal, el esquema de inmunización fue de 1 dosis (6 µg de proteína + 100 µl de adyuvante) cada 15 días por 2 meses.

Los anticuerpos fueron obtenidos de acuerdo al esquema de inmunización de 4 etapas, posteriormente fue sangrado el animal por vía ocular para monitorear la producción de los anticuerpos policlonaes anti-miosina cardiaca canina. Los anticuerpos obtenidos se ensayaron con técnicas inmunoenzimáticas de ELISA (Inmunoensayo enzimático) ¹²⁵ e inmunoelectrotransferencia ¹²⁶.

Los animales se seguirán manteniendo vivos para poder llevar a cabo los pasos siguientes hasta la obtención de los anticuerpos monoclonales anti-miosina los cuales servirán como método de diagnóstico para el IAM, ya que afortunadamente existe una reacción cruzada con los anticuerpos murinos policlonales anti-miosina y tejido cardiaco humano.

4.4 PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS :

Los anticuerpos policlonales se ensayaron en cortes histológicos de corazón humano con IAM, estos cortes se trataron para eliminar la peroxidasa endógena previamente con H_2O_2 , la dilución de los anticuerpos fue de 1:50 y se revelaron con 3,3-diaminobenzidina, se siguieron por microscopio y se contrastaron los cortes con hematoxilina.

Con estas pruebas histoquímicas se pretende demostrar que efectivamente la miosina cardiaca canina cruza con la miosina cardiaca humana.

Los cortes histológicos de corazón humano con IAM en parafina fueron proporcionadas por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

5 RESULTADOS

5.1 EXTRACCIÓN DE LA MIOSINA CARDIACA CANINA:

Los resultados obtenidos en la extracción de la miosina cardiaca canina se muestran en la **fig.1**, el gel de poliacrilamida está al 7.5% y se realizó tinción de plata, se puede observar, en el carril 1, el patrón proteínico de la miosina nativa, en el cual se encuentran todas las proteínas extraídas del homogenizado de tejido cardíaco, se hallan más de 20 proteínas, principalmente de pesos moleculares altos (superiores a 116 Kd) las cuales son las más abundantes. De las proteínas de bajo peso molecular solo una de ellas se encuentra en mayor concentración con un peso molecular (PM) aproximado de 60 Kd. En el carril 2 se muestra miosina comercial; presenta aproximadamente 10 bandas de proteínas también son principalmente de alto peso molecular. En el carril 3 se indican los estándares de pesos moleculares conteniendo: ovoalbúmina de 45 Kd., albúmina bovina de 66 Kd, y β -galactosidasa de 116 Kd.

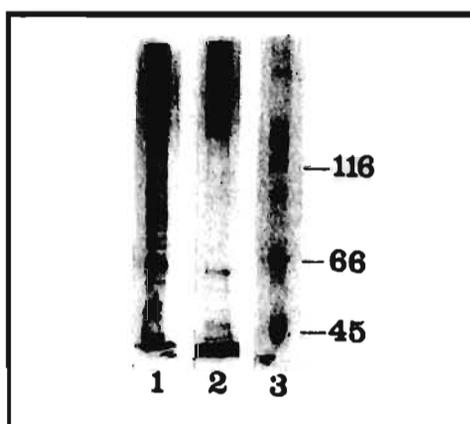


FIG. 1
Extracción de Miosina Cardiaca Canina. Gel de poliacrilamida al 7.5 %, tinción con plata. Carril 1.- Miosina Nativa, Carril 2.- Miosina comercial, Carril 3.- Estándares de pesos moleculares (Ovoalbúmina 45 Kd, albúmina bovina 66 Kd y β -galactosidasa 116 Kd).

Posteriormente se realizó una inmunoelectrotransferencia para demostrar que en el primer extracto se encontraba la miosina nativa para continuar con la purificación de la misma, así, los resultados obtenidos del inmunoblot están en la **fig.2**, en el carril 1 se corrió miosina comercial y en el carril 2, miosina nativa, se empleó como primer anticuerpo comercial anti-IgG de conejo contra miosina, como se puede observar en el carril 1 solo se reconoce una sola banda proteínica. En el carril 2 el reconocimiento de la miosina es mucho mayor tanto de alto como de bajo peso molecular, son aproximadamente siete bandas proteínicas y es importante la concentración de miosina de alto peso molecular que se observa.

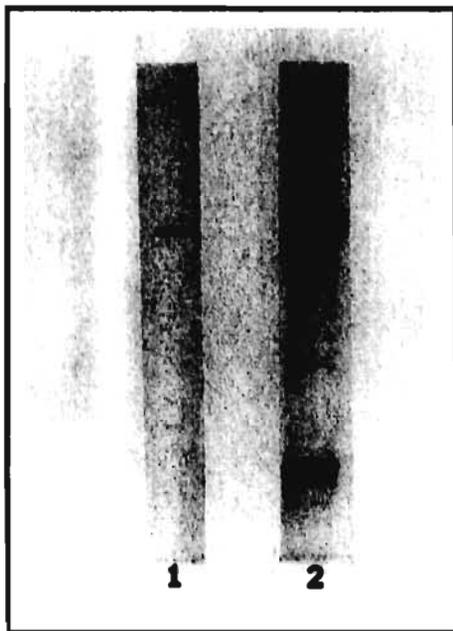


FIG. 2
Inmunotransferencia de la Extracción de Miosina Cardíaca Canina empleando anticuerpo antimiosina comercial. Carril 1.- Miosina comercial, Carril 2.- Miosina Nativa.

5.2 PURIFICACIÓN DE LA MIOSINA CARDIACA CANINA:

5.2.1 POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Los resultados obtenidos de la purificación por precipitación con sulfato de amonio, se representan en la **fig. 3**. En el carril 1 se muestra el extracto de la miosina nativa; en dicho extracto se encuentran todas las proteínas extraídas, como se mencionó anteriormente son 20 bandas de proteínas extraídas; 7 de las cuales son mayores a 116 Kd, 3 bandas menores a 66 Kd y aproximadamente 8 proteínas entre 66 y 45 Kd; de todas estas proteínas las más abundantes son: dos de PM mayor a 116 Kd, otra de 60 Kd, y otras 3 cercanas a 45 Kd aproximadamente. En el carril 2 se encuentra el patrón proteínico del método de purificación por precipitación con sulfato de amonio; como puede observarse se enriqueció la muestra de miosina de alto peso molecular presentándose solo 3 bandas proteínicas principales, sin embargo aún se obtienen aproximadamente 7 proteínas de menor PM, las cuales en comparación con todas las bandas del extracto de miosina nativa la concentración y número de estas es menor.



FIG. 3
Purificación de la Miosina Cardíaca Canina, por Precipitación con sulfato de amonio, gel de poliacrilamida al 7.5 %, tinción con plata. Carril 1.- Miosina nativa, Carril 2.- Patrón proteínico de la purificación por precipitación.

5.2.2 POR ELECTROELUCIÓN.

Los resultados obtenidos de la purificación por electroeluciones se encuentran en la **fig. 4** : Se realizaron varias electroeluciones, en el carril 1 está la purificación de la primera electroelución en la que se observan 3 bandas proteínicas con PM mayores a 116 Kd. En el carril 2 corresponden a la 2a purificación, se encuentran dos bandas de proteína de pesos moleculares muy cercanos. En el carril 3 se presenta la miosina obtenida en la tercera electroelución, como puede observarse solo hay una banda proteínica de alto PM, y finalmente en el carril 4 se muestra el patrón proteico de la miosina comercial; en donde se puede apreciar una serie de bandas proteínicas (más de 10 proteínas); tanto mayores a 116 Kd como menores a 66 Kd, las que se encuentran en mayor concentración son: una de PM mayor 116 Kd y otra mayor a 45 Kd. Las muestras así obtenidas se diluyeron, por lo que se tuvieron que concentrarse por liofilización, algunas de éstas posteriormente no se lograban resuspender formándose agregados que afectaron el rendimiento.

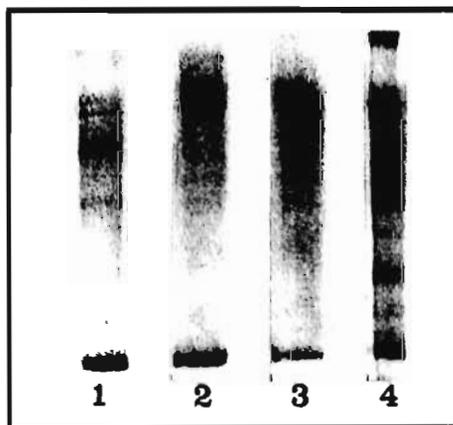


FIG. 4
Purificación de la Miosina Cardíaca Canina por Electroelución, gel de poliacrilamida al 7.5 %, tinción con plata. Carril 1.- Primera electroelución, Carril 2.- Segunda electroelución, Carril 3.- Tercera electroelución, Carril 4.- Miosina comercial.

5.2.3 POR ISOELECTROENFOQUE.

En la **fig. 5** se presentan los resultados obtenidos de la purificación de la miosina con electroforesis por punto isoeléctrico. Se obtuvieron 20 fracciones, con un rango de pH de 2 a 14, en el **gel A** se encuentran las fracciones del 1 al 10, en el carril 1 no se aprecia alguna proteína, en el carril 2 se observa una ligera banda de proteína con PM aproximado a 66 Kd, en el tercer carril hay aproximadamente 3 bandas de las cuales son 2 las más prominentes, una de alto peso molecular y otra cercana a 45 Kd, en los siguientes carriles ya es clara la presencia de las diferentes proteínas, tanto en los carriles 4,5,6,7 y 8 se encuentra un patrón proteínico semejante solo varían las concentraciones de las bandas de proteína, se encuentran más de 15 proteínas de las cuales 9 son las más abundantes y de éstas 4 son de PM mayor a 116 Kd estas últimas se encuentran concentradas en los carriles 4,5 y 6 principalmente, en los carriles 9 y 10 están las fracciones correspondientes en las que se observan menor número de proteínas (5 y 6 bandas). Del carril 3 al 10 se observa una proteína de 45 Kd aproximadamente la cual es muy abundante. En el **gel B** se reúnen las fracciones del 11 al 20 y la proteína que se precipitó entre la fracción 12 y 13 está en el **carril a**, del carril 1 al 3 se disminuye el número de bandas, siendo 5 proteínas aproximadamente las que aparecen, en el carril 4 y 5 correspondientes a las fracciones 14 y 15 solo se encuentran 5 y 3 bandas proteínicas las cuales son de PM entre 45 y 116 Kd, en los carriles 6,7,8 y 9 el patrón proteínico es semejante, variando la concentración de las proteínas, en la última fracción (carril 20) se observan 2 proteínas en muy baja concentración, en el **carril a** se encuentran cerca de 15 proteínas, las más abundantes son de bajo peso molecular. Las 20 fracciones se probaron por inmunopunto con el anticuerpo anti-miosina comercial, debido a que la señal fue intensa en varias fracciones la elección para inmunizar a los ratones también fue

determinada considerando el patrón proteínico ya realizado.

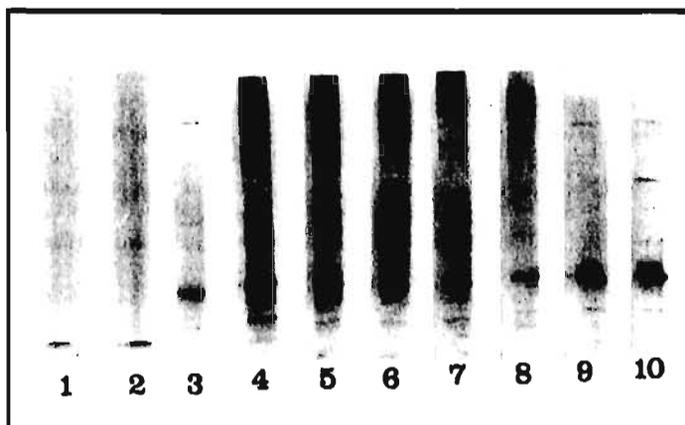


FIG. 5A
Purificación de la Miosina Cardíaca Canina por punto isoelectrico, gel de poliacrilamida al 7.5 %, tinción con plata. Fracciones de la 1 a la 10.



FIG. 5B
Purificación de la Miosina Cardíaca Canina por punto isoelectrico, gel de poliacrilamida al 7.5 %, tinción con plata. Carriles del 1 al 10 correspondientes a las fracciones 11 a la 20 y carril a correspondiente a la fracción precipitante.

5.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-MIOSINA :

De las fracciones de miosina purificada por electroforesis por punto isoeléctrico, se seleccionó las fracciones 14 y 15, debido a su pureza y alta concentración para la inmunización de los ratones con adyuvante incompleto de Freund, de acuerdo a un esquema de inmunización de 4 etapas, posteriormente fue sangrado el animal y probados los sueros policlonaes por ELISA. Los sueros policlonaes de los ratones inmunizados fueron titulados con esta técnica utilizando como antígeno la miosina purificada por precipitación con sulfato de amonio y el tiempo de incubación del primer anticuerpo fue de toda la noche, se obtuvo un título de 1:6400 y para utilizarlo en inmunotransferencia el título fue de 1:5000. Las proteínas de las 20 fracciones purificadas y el precipitado producto de la misma dan positivas al INMUNOPUNTO con el suero policlonaal de los ratones, como puede observarse en la fig.6.

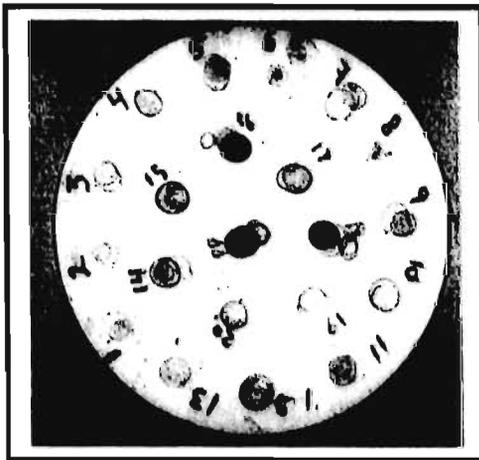


FIG. 6
Producción de anticuerpos policlonaes anti-Miosina. Inmunopunto con suero policlonaal de los ratones inmunizados contra las fracciones purificadas por isoelectroenfoco.

5.4 RECONOCIMIENTO DE LAS FRACCIONES DE MIOSINA CARDIACA CANINA POR ANTICUERPOS POLICLONALES.

Los resultados obtenidos de las 3 técnicas empleadas para la purificación de la miosina cardiaca canina, se muestran en la **fig.7**:

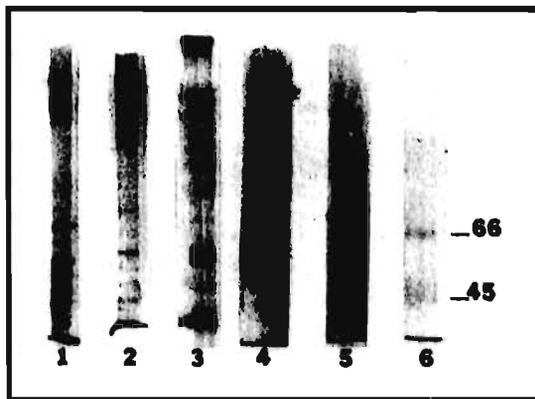


FIG. 7
Diferentes técnicas de purificación de Miosina Cardiaca Canina, gel de poliacrilamida al 7.5 %, tinción con plata. Carril 1.- Extracción de la Miosina nativa, Carril 2.- Miosina purificada por precipitación con sulfato de amonio, Carril 3.- Miosina comercial, Carril 4.- Miosina purificada por electroelución, Carril 5.- Fracción 15 de la Miosina purificada por punto isoeléctrico, Carril 6.- Estándares de pesos moleculares. (Ovoalbúmina 45 Kd, albúmina bovina 66 Kd).

En el carril 1 se muestra la extracción de la miosina nativa, en donde se aprecian todas las bandas de proteínas que conforman nuestro extracto de miosina nativa formado aproximadamente de 20 proteínas, con rangos de pesos moleculares mayores de 116 Kd hasta 45 Kd las proteínas más abundantes corresponden a la miosina de alto PM, principalmente. En el carril 2 se observan los resultados obtenidos de la purificación por precipitación con sulfato de amonio; en donde hay una disminución en el número de bandas proteínicas, se enriquecen las proteínas de PM mayores a 116 Kd, correspondientes a la miosina. En el carril 3 se observa la miosina comercial, la cual cuenta con un poco de contaminación ya que se observan varias bandas de proteínas entre 66 y 45 Kd de PM. En el

carril 4 se observa la miosina purificada por electroeluciones; en dicho carril se observa sólo una proteína de alto PM, mayor a 116 Kd, la cual aunque está muy pura no se cuenta con una concentración de muestra suficiente para inmunizar a los ratones. En el carril 5 se muestra la miosina de la fracción 15 purificada por electroforesis por punto isoeléctrico con un gradiente de pH=3-10, en donde se observan 3 bandas proteínicas de PM menor a 116 Kd. En el último carril se aprecia la mezcla de marcadores de PM.

Con el gel anterior se realizó una inmunotransferencia y los resultados se encuentran en la **fig. 8**, se empleó como 1er. anticuerpo el suero policlonal de los ratones inmunizados, en el carril 1 miosina nativa, carril 2 miosina purificada por precipitación con sulfato de amonio, carril 3 miosina comercial, carril 4 miosina purificada por electroeluciones, miosina purificada por punto isoeléctrico carril 5 y en el carril 6 marcadores de peso molecular marcados con biotina. Como puede observarse en el suero policlonal hay anticuerpos que reconocen la miosina con todos los métodos de purificación, con la miosina nativa se distinguen numerosas bandas de proteína, con las diferentes purificaciones se disminuye el registro de proteínas hasta obtener solo una banda proteínicas con la electroelución (carril 4), sin embargo, con las fracciones del isoelectroenfoque son dos bandas de miosina de peso molecular menor a 66 Kd.

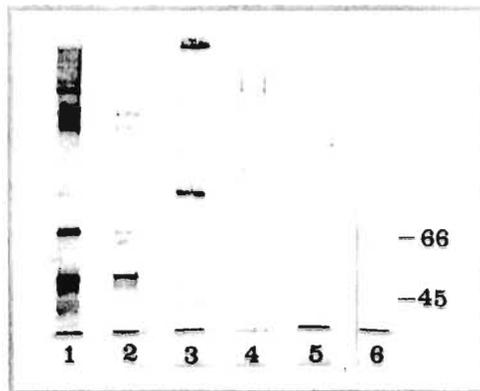
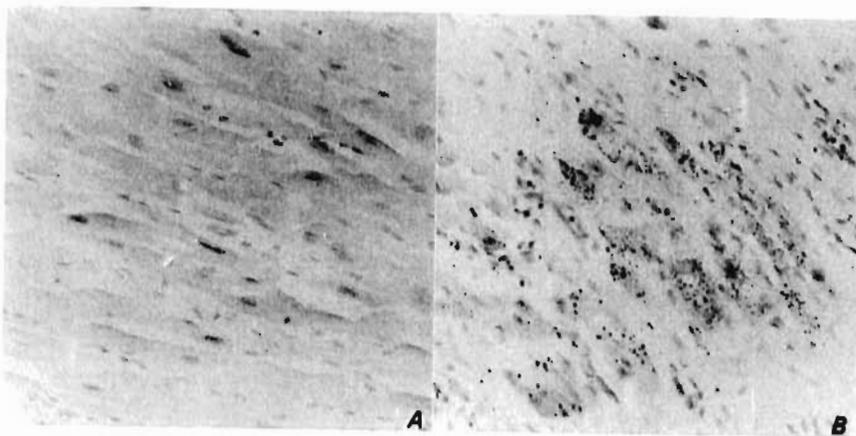


FIG. 8
 Inmunotransferencia de las diferentes técnicas de purificación de Miosina Cardíaca, revelado con suero policlonal de los ratones inmunizados. Carril 1.- Extracción de la Miosina nativa, Carril 2.- Miosina purificada por precipitación con sulfato de amonio, Carril 3.- Miosina comercial, Carril 4.- Miosina purificada por electroeluciones, Carril 5.- Fracción 15 de la Miosina purificada por electroforesis por punto isoelectrico, Carril 6.- Estándares de pesos moleculares con biotina. (Ovoalbúmina 45 Kd, albúmina 66 Kd).

5.5 PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS:

En la **fig. 9** se encuentran los cortes histológicos de corazón humano, los cuales fueron tratados con el suero policlonal de los ratones inmunizados, como puede observarse en **A** el tejido no esta lesionado por lo que los anticuerpos no reaccionan, en **B** se puede identificar claramente la zona infartada por la señal del anticuerpo anti-miosina y segundo anticuerpo peroxidado.



6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como ya se mencionó las enfermedades cardiacas se han ido incrementando, constituyendo un problema de salud pública importante, de acuerdo a las estadísticas proporcionadas por el INEGI en 1991 las enfermedades del corazón constituyen la primera causa de muerte en la población general. El IAM es la causa principal de estos fallecimientos, por lo tanto el diagnóstico temprano del padecimiento es fundamental.

La Organización Mundial Cardíaca establece el criterio de diagnóstico para IAM en el que se incluye: síntomas clínicos compatibles con isquemia aguda, anomalías ECG y un patrón enzimático relacionado con daño miocárdico. En la actualidad se realizan gammagrafías cardiacas las cuales permiten hacer una mejor evaluación, esta metodología emplea radionucleótidos como el pirofosfato marcado con Tc^{99m} , recientemente se ha empezado a introducir los anticuerpos monoclonales anti-miosina marcados con In^{111} . Por lo tanto el presente trabajo constituye el inicio del proyecto de anticuerpos anti-miosina para establecer el método de diagnóstico en el hospital de cardiología.

Las prácticas médicas modernas requieren de una rápida decisión, los métodos de diagnóstico usados para evaluar pacientes con posible isquemia miocárdica deben ser simples y sensibles para poder llevarse a cabo de manera rápida y con exacta realización. Teniendo como objetivos: 1.- Diferenciar los pacientes con o sin IAM, ya que sólo un pequeño porcentaje 10-20% de pacientes con dolor de pecho y otros síntomas compatibles con isquemia tienen infarto. Con los marcadores moleculares se puede diferenciar rápidamente este problema y poder tomar una decisión sobre los pacientes que necesitan un tratamiento con trombolíticos y cuales no lo requieren, 2.- Distinguir los pacientes que tienen una recanalización coronaria

después de tratamientos con agentes antitrombóticos y 3.- Estimar la extensión del tejido dañado y predecir la supervivencia después del IAM ¹²⁷.

Las características ideales de los marcadores para daño miocárdico son: 1.- Encontrarse en alta concentración en el miocardio, 2.- No encontrarse en otro tejido, teniendo uniformidad bajo condiciones patológicas, 3.- Liberarse completa y claramente después del daño miocárdico, 4.- Liberarse en proporción directa a la extensión del daño y 5.- Permanecer en el plasma por varias horas para proporcionar el tiempo necesario para el diagnóstico, pero no tan grande que no pueda identificarse el daño.

Otros factores determinantes para los marcadores moleculares son la sensibilidad y especificidad que requieren características como: poder precisar el tamaño y localización celular, presentar una solubilidad adecuada, poseer alta afinidad por el tejido cardíaco y que con el mismo produzca una reacción irreversible y detectable ¹²⁷.

Los anticuerpos son moléculas que cumplen con prácticamente todos los requisitos anteriores por lo que para obtener anticuerpos específicos contra miosina se realizó una extracción de esta molécula a partir de miocardio de perro por homogenización del tejido, y solubilización de las proteínas hidrofílicas por lo que primeramente se trató el tejido miocárdico canino con la solución I; posteriormente la miosina se obtuvo con una solución de cloruro de potasio, ya que la miosina es altamente soluble en concentraciones elevadas de potasio evitándose prolongadas centrifugaciones teniendo así un buen rendimiento como se observa en la primera fig. 1.

Las técnicas más empleadas para la extracción de la proteína están enfocadas a la obtención de miosina de dos formas, en solución y agregada, ya que la asociación con otras proteínas está

relacionada a su función en la contracción del músculo y a su actividad de ATPasa.^{128,129,130}

En la fig. 1 se observa nuestro extracto de miosina nativa en donde la proteína de alto peso molecular (aproximadamente 116 Kd) se observa enriquecida, aunque en el extracto proteínico se arrastran contaminantes posiblemente albúmina, tropomiosina, actina, etc., los cuales durante el proceso de purificación se eliminan.

En la fig. 2 se muestra una inmunotransferencia utilizando como primer anticuerpo comerciales anti-IgG hecho en conejo para demostrar que efectivamente en nuestro extracto proteínico se encontraba la miosina canina extraída.

Como fue mencionado con anterioridad los anticuerpos anti-miosina ya existen en el mercado mundial; sólo que su elevado costo no permite un uso generalizado en aquellos pacientes que tienen afecciones cardiacas, de ahí la importancia de la extracción, purificación y producción de los anticuerpos policlonales anti-miosina título que encabeza este trabajo; no solo a nivel hospitalario, sino en México.

Después de la obtención del extracto anterior que denominaremos miosina nativa se probaron tres técnicas comparativas de purificación para eliminar los contaminantes presentes en el mismo, la precipitación con sulfato de amonio enriquece la preparación, aún se aprecian contaminantes pero el rendimiento es muy elevado, aproximadamente del 80% de recuperación. La experiencia así obtenida muestra que esta técnica puede ser utilizada previamente a otra técnica de purificación, pues elimina un mayor número de contaminantes en comparación con nuestro extracto de miosina nativa, cuyos resultados se aprecian en la fig. 3. Posteriormente con los resultados obtenidos en la fig. 4 se observa que en la purificación por electroelución se obtuvo un mayor grado de pureza que con la técnica anterior, esto debido a que se selecciona

una sola banda de proteína; la más pura, el inconveniente que tiene esta técnica de purificación es que la muestra se diluye mucho, por lo que al concentrarla por medio de la liofilización se producen agregados difíciles de romperse y por consiguiente nos dan un rendimiento más bajo. Y finalmente la purificación por isoelectroenfoque cuyos resultados se observan en la fig. 5A y 5B; en la que las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico, dentro de un rango de pH determinado, se alcanzó por medio de esta técnica una mayor cantidad de la muestra, un mayor rendimiento y por lo tanto una mayor concentración de proteína, con este procedimiento se obtienen 2 fracciones (14 y 15) con sólo tres bandas de proteínas fig. 7, con las cuales fueron inmunizados los ratones obteniéndose así los anticuerpos policlonales, los cuales fueron probados por ELISA y titulados con dicha técnica obteniéndose un título de 1:6400. El suero policlonal de los ratones inmunizados también fue probados por inmunopunto resultados observados en la fig. 6, con lo que se comprueba que los anticuerpos policlonales anti-miosina reconocen los fragmentos de miosina. Una vez obtenidos estos anticuerpos policlonales anti-miosina se realizaron inmunotransferencias utilizándose éstos como primer anticuerpo; donde se comparan las 3 técnicas de purificación, y se verifica que los anticuerpos policlonales anti-miosina producidos en el laboratorio reconocen los fragmentos de miosina como se muestra en la fig. 8. Así mismo en las inmunohistoquímicas con el suero policlonal se demuestra que los anticuerpos reconocen la miosina que se encuentra en las células lesionadas en la periferia de la zona del IAM en tejido humano, esto es debido a que como puede distinguirse en la fig 9 en la zona no infartada no se observa alguna señal con los anticuerpos y es claro en la fig. 9B como en las células dañadas si, permiten el paso de los mismos, observándose precipitación del cromógeno.

La producción de estos anticuerpos policlonales anti-miosina proporciona el inicio del proyecto con la finalidad de la producción de anticuerpos monoclonales anti-miosina con fines de uso diagnóstico ya que los ensayos en general deben ser altamente sensibles y poco variables y estos anticuerpos pueden proporcionar el método de diagnóstico para varias cardiopatías.

La especificidad del daño irreversible ha tenido dificultad para definir los límites en la detectabilidad de proteínas marcadoras en el plasma, la cual está relacionada con los niveles normales de plasma presentes y la sensibilidad del ensayo. La pequeña relación que alcanzan las proteínas que no se pueden detectar después de la irreversibilidad de la isquemia están en base a la sensibilidad del ensayo y al incremento de los niveles de plasma que no exceda el rango fisiológico del marcador¹⁷⁷.

Las imágenes nucleares pueden ser utilizadas para la localización del tamaño, estas técnicas se basan en la utilización de radionucléotidos marcados; usualmente el pirofosfato marcado con Tc ^{99m}. El pirofosfato marcado con tecnecio es un agente sensible y específico para la detección de IAM, pero tienen la desventaja de tener poca persistencia en la actividad del flujo sanguíneo y el bajo grado de marcaje en el corazón; además que las imágenes presentan confusión debido a que el pirofosfato se une al calcio de las costillas y al esternón causando interferencia y dificulta la visibilidad de las imágenes del miocardio ^{99,100}, otra de las desventajas que presenta este compuesto es que se debe esperar por lo menos de 24 a 48 hrs. después de administrado el radionucléotido para una mejor observación de las imágenes nucleares. La dificultad de esto radica en el hecho de que la vida media del Tecnecio es de 6

horas ¹⁰¹ por lo que continuamente se debe seguir administrando el radionucleótido para poder tener un seguimiento del estudio y poder evaluar al paciente ¹⁰².

Posteriormente se empezó a utilizar esta misma técnica, sustituyendo los pirofosfatos por los anticuerpos monoclonales anti-miosina marcados con In ¹¹¹, estos han sido de gran utilidad para la localización de IAM. Son administrados por vía intravenosa de 12-36 hrs. después del inicio del dolor precordial y se observan en 3 planos a las 24 hrs. de ser administrados, esto es posible gracias a que la vida media del In ¹¹¹ es de 2.81 días; por lo que sólo basta una dosis para poder desarrollar una evaluación completa del paciente. Estos anticuerpos en estudio no han presentado ninguna reacción alérgica y las imágenes se evalúan por la presencia o ausencia de anticuerpos en la región miocárdica ¹³¹. Del mismo modo estos anticuerpos han mostrado que la presión arterial y el ECG no desarrollan cambios después del tratamiento.

El tiempo de visualización óptimo es de 12-20 hrs. después de la administración o de 16-24 hrs. después del infarto. La visualización recomendada es de 18 hrs. después de la administración de los anticuerpos. La utilización de los anticuerpos permite una alta especificidad para la identificación de tejido dañado únicamente con antígenos. En pacientes con IAM la miosina expuesta es la que promueve la unión de los anticuerpos y estos pueden marcarse con material radioactivo, sin dejar que estos pierdan su actividad y especificidad ¹³².

Los anticuerpos monoclonales anti-miosina no sólo han sido utilizados para el diagnóstico de IAM, sino de otras enfermedades asociadas con miocarditis ¹³³, cuyo diagnóstico requiere de biopsias ventriculares; sin embargo a pesar de la especificidad de las mismas, estas carecen de sensibilidad, debido a la naturaleza focal de la enfermedad y la falta de muestras suficientes de los sitios miocárdicos ¹³⁴.

Este método de diagnóstico de IAM es no invasivo¹³³, donde no sólo es eficiente para el diagnóstico de IAM¹¹², sino también como diagnóstico diferencial en otros padecimientos cardiovasculares como miocarditis, ya que ayuda a establecer junto con las biopsias un diagnóstico histológico¹³³.

En un estudio clínico más amplio, se compararon los resultados obtenidos de las imágenes anti-miosina y los de las biopsias miocárdicas. Se reportó que con los anticuerpos se registró el 61% de los casos positivos a miocarditis, mientras que sólo se reportó el 32% positivo con las biopsias miocárdicas, con este estudio podemos decir que las imágenes nucleares con anti-miosina no sólo se puede establecer un método de diagnóstico diferencial, sino también como método de corroboración de diagnóstico¹³³.

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-miosina son específicos sólo para miocitos necrosados, en donde se corroboran los resultados que fueron positivos en los análisis con la anti-miosina con los de las biopsias. Un dato positivo con anti-miosina indica la necesidad de utilizar biopsias endomiocárdicas para establecer un diagnóstico histológico. Confirmado el estudio de un gran número de pacientes, puede ser posible el evitar el diagnóstico por biopsias en pacientes quienes presentaron un resultado negativo¹³⁵.

El estudio de la gammagrafía con los anticuerpos anti-miosina ha sido de gran utilidad por ser una detección no invasiva de miocitos necrosados asociados al IAM con la sensibilidad y especificidad de 90%¹³⁶⁻¹⁴⁰.

De los resultados obtenidos podemos concluir que: el método de extracción de miosina cardíaca fue rápido y la miosina nativa en esta muestra está altamente enriquecida.

La purificación de la miosina por precipitación con sulfato de amonio elimina algunos contaminantes.

La técnica de electroelución permite obtener la proteína de mayor peso molecular pero la concentración fue mínima.

La purificación por isoelectroenfoque nos proporcionó dos fragmentos de miosina, los cuales al inmunizar a los ratones se obtuvieron anticuerpos policlonales que pueden reconocer a la miosina en una fase de degradación, por lo que, estos anticuerpos pueden delimitar la zona de infarto en el tejido.

Con los anticuerpos policlonales anti-miosina así obtenidos se seguirá el trabajo en estudio para la obtención de los anticuerpos monoclonales anti-miosina, ya que estos pueden ser empleados como método de diagnóstico diferencial para la evaluación de otros padecimientos cardíacos.

APÉNDICE LISTA DE SOLUCIONES ESPECIALES

Amortiguador para Electroforesis	
Glicina	2 M
Tris(hidroxi-metil) amino-metano (TRIS-BASE)	250 mM
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	35 mM
Agua aforar a	2000 ml
Amortiguador de Transferencia	
Solución 10 X	
Tris(hidroxi-metil) amino-metano (TRIS-BASE)	48.45 gr
Glicina	230.7 gr
Agua aforar a	2000 ml
Solución 1 X	
Solución 10 X	400 ml
Alcohol Metilico (CH ₃ OH)	800 ml
Agua aforar a	40000 ml
Cocxel para muestras de Electroforesis	
Tris(hidroxi-metil) amino-metano ajustar pH con HCl (TRIS-HCL) 0.5 M pH=6.8	0.5 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	0.1 gr
Glicerol	1.0 ml
Azul de bromo fenol	1 ml
Agua	10 ml
Soluciones para la Extracción de Miocina	
Solución 1 pH=7	
Fosfato monobásico de sodio (NaH ₂ PO ₄)	50 mM
Etilenglicol-bis(beta-amino-etil eter) N,N' -tetra-acetato de potasio (K ₂ H ₂ EGTA)	1 mM
Fluoruro de fenil-metil-sulfonio (PMSF)	0.125 mM
Solución 2 pH= 6.7	
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ H ₂ PO ₄)	150 mM
Cloruro de sodio (NaCl)	300 mM
Adenosil-Trifosfato de Sodio (Na ₂ ATP)	10 mM
Etilenglicol-bis (Beta-Amino-Etil-Eter) N,N' tetra-acetato de potasio (K ₂ H ₂ EGTA)	1 mM
Fluoruro de Fenil-Metil-Sulfonio (PMSF)	0.125 mM
2-mercaptotanol	1 mM
Geles de Poliacrilamida al 7.5%	
Gel Separador	
Acrilamida	2.81 ml
Tris(hidroxi-metil) amino-metano ajustar pH con HCl (TRIS-HCL) 1.5 M pH=8.8	2.8 ml
Agua	5.51 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	0.23 ml
N,N,N',N'-Tetra-metil-etil-enediamina (TEMED)	10 µl
Persulfato de amonio (H ₂ N ₂ O ₈ S ₂)	100 µl
Gel Concentrador	
Acrilamida	0.25 ml
Tris(hidroxi-metil) amino-metano ajustar pH con HCl (TRIS-HCL) 1.5 M pH=8.8	0.67 ml
Agua	1.14 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	0.018 ml
N,N,N',N'-Tetra-metil-etil-enediamina (TEMED)	1.8 µl
Persulfato de amonio (H ₂ N ₂ O ₈ S ₂)	12.2 µl
Soluciones para Purificación por Electroelución	
Solución de Tris(hidroxi-metil) amino-metano (TRIS-BASE) y glicina	10 mM
	150 mM
Cloruro de potasio (KCl)	0.25 M

Soluciones para Purificación por Isoelectroforesis

Glicerol	10 ml
Anfóteros con pH= 3 a 10	1 %
Cloruro de potasio (KCl)	0.5 M
Tris(hidroxi-metil) amino-metano (TRIS-BASE)	10 mM

Soluciones para Purificación por Precipitación

Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄) 41 gr para 100 ml	40 %
Cloruro de potasio (KCl)	0.5 M
Solución amortiguadora de Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄) y Acido Etilendiamino tetra-acético (EDTA) pH=7	0.15 M
	10 mM

Reactivo de Bradford

Azul de Coomassie	100 mg
Alcohol etílico (C ₂ H ₅ OH) al 95 %	50 ml
Ácido Fosfórico (H ₃ PO ₄) al 8.5%	100 ml
Agua afora	2000 ml

Reactivo de O-fenil diamina

Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	0.1 M
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ H ₂ PO ₄)	0.2 M
O-fenil-diamina	5 mg
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	30 %
Agua afora	12.5 ml

Tinción de Coomassie 50%

Coomassie R	300 mg
Alcohol isopropílico (C ₃ H ₈ O)	250 ml
Ácido acético glacial (C ₂ H ₄ O ₂)	37.5 ml
Agua afora	500 ml

Tinción de Plata

Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.36%	27 ml
Hidróxido de amonio (NH ₄ OH) al 20.5 %	1.5 ml
Nitrato de plata (AgNO ₃) al 10% en H ₂ O	5 ml
Agua afora	100 ml

Soluciones para ELISA

Solución de carbonatos	0.1 M
PBS-pH=7.4- 1X	
Amortiguador de Fosfato de sodio (Na ₂ PO ₄) y cloruro de sodio (NaCl)	0.015 M, 0.15 M
PBS-pH=7.4- 1X y Monolauril polioxietileno-sorbitano (Tween 20)	99.9 ml, 0.1 ml
Albumina en PBS-pH=7.4 1X	0.5 gr

7 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Lyons K.P., Olson H.G., Aronow W.S.: Sensitivity and Specificity of Tc-99m pyrophosphate myocardial scintigraphy for the detection of acute myocardial infarction. Clin. Nucl. Med. 5:8-11, 1980. M., Cortadellas J. et. al.: Diagnóstico del IAM mediante anticuerpos antimiosina. Rev. Esp. Med. Nucl. 9:11 (abstract), 1990.
- 3.- Cortadella j., Candell Riera., Castell C., Fraile López amor, González J.M., soler Soler J., and Domenech Torne.: Detección del Infarto agudo de miocardio sin onda Q: Anticuerpos antimiosina marcados con tecnecio-99m. Cardiol, 46:152-159, 1993.
- 4.- American Heart Association: 1987 Heart Facts. Dallas, American Heart Association National center.
- 5.-Levin, D.C., and Fallon, J.T.: Significance of the angiographic morphology of localized coronary stenoses: Histopathologic correlation. Circulation 66: 316, 1982.
- 6.-Falk, E.: Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating thrombosis: Characteristics of coronary atherosclerotic plaque underlying fatal occlusion thrombi. Br. Heart J. 50:127, 1983.
- 7.- Davies, M.J., and Thomas, A.C. : Plaque fissuring- the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. Br. Heart J. 53:363, 1985.
- 8.- Forrester. J.s., Litvack, F.,Grundfest, W., and Hickey, A.: A perspective of coronary disease seen through the arteries of living man. Circulation 75:505, 1987.
- 9.-Wilson, R.F., Hoidal, M.D., and White, C.W.: Quantitative angiographic morphology of coronary stenoses leading to myocardial infarction or unstable angina. Circulation 73:286, 1986.
- 10.- Frans Van De Werf: Infarto al Miocardio. Mundo Científico No.114, Vol.II: 597-605,
- 11.- Miller, R.D., Burchell, HB. and Edwards, TE.: Myocardial infarction with and without acute coronary occlusion: a pathologic study. Arch.Intern.Med. 88:597, 1951
- 12.- Cheitlin. M.D., McAllister, H.A., and deCastro, C.M.: Myocardial infarction without atherosclerosis. J.A.M.A. 231:951, 1975.
- 13.- Spodick, D.H.: Inflammation and the onset of myocardial infarction. Am. Intern. Med. 102:699, 1985.
- 14.- Connolly, J.E., Eldridge, F.L., Calvin, J.W., and Stemmer E.A.: Proximal coronary artery obstruction. N. Engl. J.Med. 271:231, 1964.

- 15.- Morris S.A., Torowitz H.B., Wittner M., Bilezikian J.P.: Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*, 82:1900-1909, 1990 and Kirchhoff LV: American Trypanosomiasis (Chagas' disease)-a tropical disease now in the United States. *N.Engl. J. Med.* 329:639-644, 1993.
- 16.- Pick, R.A., Golver, M.U., and Viewerg, W.V.R.: Myocardial infarction in a young woman with isolated coronary arteritis. *Chest*. 82:378, 1982.
- 17.- Homcy, C.J., Liberthson, R.R., Fallon, J.T., Gross, S., and Miller, L.M. : Ischemic heart disease in systemic lupus erythematosus in the young patient: Report of six cases. *Am. J. Cardiol.* 49:481, 1982.
- 18.- Freifeld, A.G. Schuster, E.H., and Bulkley, B.H.: Nontransmural versus transmural myocardial infarction. *Am.J.Med.* 75:423, 1983.
- 19.- DeWood, M.A., Stifter, W.F. Simpson, C.S., Spores, J., Eugster, G.S., Judge, T.P., and Hinnen, M.L.: Coronary arteriographic finding soon after non-Q wave myocardial infarction. *N.Engl. J. Med.* 315:417, 1986.
- 20.- Pipberger, H.V. and Lopez, E.A.: "silent subendocardial infarcts: Fact of fiction? *Am.Heart J.* 100:597, 1980.
- 21.- Phibbs, B.: "Transmural" versus "Subendocardial" myocardial infarction: An Electrocardiographic myth. *J.Am.Coll. Cardiol.* 1:561, 1983.
- 22.- Levine, H.D.: Subendocardial infarction in retrospect: Pathologic, cardiographic, and ancillary features. *Circulation* 72:790, 1985.
- 23.- Zema, M.J.: Q-wave, S-T segment, and T-wave myocardial infarction. *Am J. Med.* 78:391, 1985.
- 24.- Schuster, E.H., and Bulkley, B.H.: Early postinfarction angina. Ischemia at a distance and ischemia in the infarct zone. *N. Engl. J. Med.* 305:1101, 1981.
- 25.- Ferguson, D.W., Pandian, N., Kioschos, J.M., Marcus, M.L., and White, C.W.: Angiographic evidence that reciprocal ST-segment depression during acute myocardial infarction does not indicate remote ischemia: Analysis of 23 patients. *Am. J. Cardiol.* 53:55, 1984.
- 26.- Mukharji, J., Murray, S., Lewis, S.E., Croft, C.H., Corbett, J.R., Willerson, J.T., and Rude, R.E.: Is anterior ST-depression with acute transmural inferior infarction due to posterior infarction? *J. Am. Coll. Cardiol.* 4:28, 1984.
- 27.- Gibson, R.S., Crampton, R.S., Watson, D.D., Taylor, G.J., Carabello, B.A., Holt, N.D., and Beller, G.A.: Precordial ST-segment depression during acute inferior myocardial infarction: Clinical, scintigraphic and angiographic correlation. *circulation.* 66:72, 1982.

- 28.- Little, W.C., Rogers, E.W., and Sodums, M.T.: Mechanism of anterior ST-segment depression during acute inferior myocardial infarction. *Ann. Intern. Med.* 100:26, 1984.
- 29.- Lew, A.S., Weiss, A.T., Shah, P.K., Maddahi, J., Peter, T., Ganz, W., Swan, H.J.C., and Berman, D.S.: Precordial ST-segment depression during acute inferior myocardial infarction: Early thallium-201 scintigraphic evidence of adjacent posterolateral or inferoseptal involvement. *J. Am. Coll. Cardiol.* 5:203, 1985.
- 30.- DeWood, M.A., Notske, R.N., Simpson, C.S., Stifter, W.F. and Shields, J.P.: Prevalence and significance of spontaneous thrombolysis in transmural myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 6:33, 1985.
- 31.- Alpert, J.S.: Coronary vasomotion, coronary thrombosis, myocardial infarction, and the camel's back. *J. Am. Coll. Cardiol.* 5:617, 1985.
- 32.- Willerson, J.T., Hillis, L.D., and Buja, L.M.: *Ischemic Heart Disease*. N. Y., Raven Press, 1982, pp. 354.
- 33.- Bouchardy, B., and Majno, G.: Histopathology of early myocardial infarcts. *Am. J. Physiol.* 74:301, 1974.
- 34.- Derias, N.W., and Adams, C.W.M.: The nonspecific nature of the myocardial wavefiber. *Histopathology.* 3:241, 1977.
- 35.- Caufield, J., Kliensky, B.: Myocardial Ischemia and Early Infarction. An Electron Microscopic Study. *Am. J. Pathol.* 35: 489, 1959.
- 36.- Fishbein, M.C., Maclean, D., and Maroko, P.R. : The histopathological evolution of myocardial infarction. *Chest* 73:843, 1978
- 37.- Langer, G.A.: The structure and function of the myocardial cell surface. In Levy, M.N., and Vassalle, M.(eds.): *Excitation and Neural control of the Heart*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1982, pp.79-92.
- 38.- Sato, S., Ashrof, M., Millard, R.W., Fujwara, H. and Schwartz, A.: Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium : An ultrastructure study. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15:261, 1982.
- 39.- Sommer, J.R., and Johnson, E.A.: Ultrastructure of cardiac muscle. In Berne, R.M.(ed.); *Handbook of Physiology*. section 2, The Cardiovascular System. Vol.1, The Heart. Bethesda, American Physiological society, 1979, pp. 113-186.
- 40.- Sommer, J.R., and Waugh, R.A.: The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell with special emphasis of the tubular membrane systems. *Am. J. Pathol.* 82:192, 1976.

- 41.- Sommer, J.R.: Ultrastructural considerations concerning cardiac muscle. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 14:(Suppl.3):77, 1982.
- 42.- Karz, A.M.: Membrane structure. In Fozzard, H.A., Haber, E., Jennings, R.B., Katz, A.M., and Morgan, H.E.(eds.): *The heart and Cardiovascular systems*. New York, Raven Press, 1986, p.101.
- 43.- Shaper, J., Meiser, E., and Stammeler, G.: Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from rats, dogs, hamsters, mice and from human heart. *Circ. Res.* 56:377, 1985.
- 44.- Fobers, M.J. and Sperelakis, N.: Ultrastructure of mammalian cardiac muscle. In Sperelakis, N. (ed): *Physiology and Pathophysiology of the Heart*. Boston, Martinus Nijhoff, 1984, pp:3-42.
- 45.- Hukley, H.E.: The double array of filament in cross-istriated muscle. *J.Biophys. Biochem. cytol.* 3:631, 1957.
- 46.- Warber, K.D., and Potter, J.D.: Contractile proteins and phosphorylation. In Fozzard, H.A., Haber, E., Jennings, R.B., Katz, A.M., and Morgan, H.E.(eds.): *The heart and Cardiovascular System*. New York, Raven Press, p.779., 1986.
- 47.- Page, S.: Management of structural parameters in cardiac muscle. CIBA Foundation Symposium 24(New series), Amsterdam, Elsevier, p.13, 1974.
- 48.- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G., and Baker, H.: substructure of the myosin molecule. V. subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* 42:1, 1969.
- 49.- Eisenberg, E., and Hill, J.L.: Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. *Science.* 277:999, 1985.
- 50.- Scheuer, J., and Bhan, A.K.: Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphatase activity and physiological function. *Circ. Res.* 45:1, 1979.
- 51.- Malhotra, A., Peaparkus, S. Fein, F.S., Sonnenblick, E.H., and Schener, J.: The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Circ. Res.* 49:1243, 1981.
- 52.- Ebashi, S.: Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to Ca-troponin-tropomyosin system. *Essays Biochem.* 10:1, 1974.
- 53.- Potter, J.D., and Gregely, J.: Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *Biochemistry* 13:2697, 1974.
- 54.- Spudich, J.A., Hukley, H.E., and Finch, J.F.: Regulations of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin. *J.Mol. Biol.* 72:619, 1972.

- 55.- Greaser, M.L., Yamaguchi, M., Breakke, C., Potter, J., and Gergely, J.: Troponin subunits and their interactions. *Cold Spring Harbor symp. quant. Biol.* 37:235, 1973.
- 56.- Perry, S.V.: The regulation of contractile activity in muscle *Biochem. Soc. Trans.* 7:593, 1979.
- 57.- Julian, F.J., Moss, R.L., and Sollins, M.R.: The mechanism for vertebrate striated muscle contraction. *Circ. Res.* 42:2, 1978.
- 58.- Eisenberg, E., and Greene, L.E.: The relation of muscle biochemistry to muscle physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 42:293, 1980.
- 59.- Langer, G.A.: Calcium at the sarcolemma. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 16:147, 1984.
- 60.- Winegrad, S.: Regulation of cardiac contractile proteins. *Circ. Res.* 55:565, 1984.
- 61.- Winegrad, S., Weisberg, A., Lin, E.L., and McClellan, G.: Adrenergic regulation of myosin adenosine triphosphatase activity. *Circ. Res.* 58:83, 1986.
- 62.- Norris, R.M.: *Myocardial infarction*. New York, Churchill Livingstone, pp 322, 1982.
- 63.- Peli, S., and Fayerweather, W.E.: Trends in the incidence of myocardial infarction and in associated mortality and morbidity in a large employed population, 1957-1983. *N.Engl.J.Med.* 312:1005, 1985.
- 64.- Pryor, D.B., Harrell, F.E., Jr., Lee, K.L., Califf, R.M., and Rosati, R.A.: An improving prognosis over time in medically treated patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 52:444, 1983.
- 65.- Guillum, R.F., Folsom, A., Luepker, R.V., Jacobs, D.R., Jr., Kottke, T.E., Gomez-Marin, O., Prineas, R.J., Taylor, H.L., and Blackburn, H.: Sudden death and acute myocardial infarction in a metropolitan area, 1970-1980. *N. Engl. J.Med.* 309:1353, 1983.
- 66.- Elveback, L.R., and Connolly, D.C.: *Coronary Heart disease in residents of Rochester, Minnesota. V. Prognosis of patients with coronary heart disease based on initial manifestation.* *Mayo Clin. Proc.* 60:305, 1985.
- 67.- Stern, M.P.: The recent decline in ischemic heart disease mortality. *Ann. Intern. Med.* 91:630, 1979.
- 68.- Konnel, W.B.: Meaning of the downward trend in cardiovascular mortality. *J.A.A.A.* 247:877, 1982.

- 69.- Goldman, L., and Cook, E.F.: The decline in ischemic heart disease mortality rates. An analysis of the comparative effects of medical interventions and changes in lifestyle. *Ann. Intern. Med.* 101:825, 1984.
- 70.- Beaglehole, R.: Medical management and the decline in mortality from coronary heart. *Br. Med. J.* 292:33, 1986. 71.- deFeyer, P.J., Van den Brand, M., Serruys, P.W., and Wijns, W.: Early angiography after myocardial infarction: What have we learned? *Am. Heart. J.* 109:194, 1985.
- 71.- Gibson, R.S., Boden, W.E., Theroux, P., Strauss, H.D., Pratt, C.M., Gheorghiad, M., Capone, R.J., Crawford, M.H., Schlant, R.C., Kleiger, R.E., Young, P.M., Schechtman, K., Perryman, M.B., Roberts, R., and the Diltiazem Reinfarction study group: Diltiazem and reinfarction in patients with non-Q-wave myocardial infarction. *N.Engl. J. Med.* 315:423, 1986.
- 72.- deFeyer P.J., Van den Brand M., Serruys P.W., and Wijns W.: Early angiography after myocardial infarction: What have we learned? *Am. Heart. J.* 109:194, 1985.
- 73.-Bristow, J.D., Burchell, H.B., Campbell, R.W., Ebert, P.A., Hall, R.J., Leonard, J.J., and Reeves, T.: Report of the ad Hoc Committee on the indications of coronary arteriography. *Circulation* 55:969 A, 1977.
- 74.- DeWodd, M.A., Spores, J., Notske, R., Mouser, L.T., Burroughs, R., Golden, M.S., and Lang, H.T.: Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N.Engl. J. Med.* 303:897, 1980.
- 75.-Timmis, G.C., Gangadharan, V., Hauser, A.M., Ramos, R.C., Westveer, D.C., and Gordon, S.: Intracoronary streptokinase in clinical practice. *Am. Heart.* 104:925, 1982.
- 76.- Buja, L.M., and Willerson, J.T.: Clinicopathologic correlates of acute ischemic heart disease syndromes. *Am. J. Cardiol.* 47:343, 1981.
- 77.- Feldman, R.L.: Editorial. Coronary thrombosis, coronary spasm and coronary atherosclerosis and speculation on the link between unstable angina and acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 59:1187, 1987.
- 78.- Joshua M., Hare M.D., Kenneth L., and Baughman M.D. : Myocarditis: current Understanding of of the Etiology, Pathophysiology, natural History and Management of inflammatory Disease of the Myocardium, *Cardiology*, 165
- 79.- Sobel, B.E., and Shell, W.E.: Serum enzyme determinations in the diagnosis and assessment of myocardial infarction. *Circulation* 45:471, 1972.
- 80.- Lee, T.H., and Goldman, L.: Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann. Intern. Med.* 105:221, 1986.

- 81.- Hearse, D.J.: Myocardial enzyme leakage. *J. Mol. Med.* 2:185, 1977.
- 82.- Ingwall, J.S., Kramer, M.F., Fifer, M.A., Lorell, B.H., Shemin, R. Grossman, W., and Allen, P.D.: The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N. Engl. Med.* 313:1050, 1985.
- 83.- Morelli, R.L., Carlson, D.J., Emilson, B. Abendshein, D.R., and Rapaport, E.: Serum creatine kinase MM isoenzyme sub-bands after acute myocardial infarction in man. *Circulation.* 67:1283, 1983.
- 84.- Vasudevan, G., Mercer, D.W., and Varat, M.A.: Lactic dehydrogenase isoenzyme determination in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Circulation.* 57:1055, 1978.
- 85.-Weidner, N.: Laboratory diagnosis of acute myocardial infarction. Usefulness of determination of lactate dehydrogenase (LDH)-level and the ratio of LDH-1 to total LDH. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 106:375, 1982.
- 86.- Goldberg, D.M., and Windfiel, D.A.: Diagnostic acuracy of serum enzyme assays for myocardial infarction in a general hospital population. *Br. Heart. J.* 34:597, 1972.
- 87.-Robert, R., and Sobel, B.E.: Isoenzymes of creatine phosphokinase and diagnosis of myocardial infarction. *Ann. Intern. Med.* 79:741, 1973.
- 88.- Lott, J.A.: serum enzyme determination in the diagnosis of acute myocardial infarction: An uptake. *Hum. Pathol.* 15:706, 1984.
- 89.- Apple, F.S., Rogers, M.A., Sherman, W.M., and Ivy, J.L.: Comparison of serum creatine kinase MB activities post-marathon race versus post myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta* 138:111, 1984.
- 90.- Jaffe, A.S., Garfinkel, B.T., Ritter, C.S., and Sobel, B.E.: Plasma MB creatine kinase after vigorous exercise in professional
- 91.- Tsung, S.H.: several condition causing elevation of serum CK-BB. *Am. J. Clin. Pathol.* 75:711, 1981.
- 92.- Roberts, R., Gowda, K.S., Ludbrook, P.A., and Sobel, B.E.: Specificity of elevated serum MB creatine phosphokinase activity in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 36:433, 1975.
- 93.- Turi, Z.G., and cooperating investigators from the Milis study group: Electrocardiographic, enzymatic and scintigraphic criteria of acute myocardial infarction as determined from study of 726 patients. *Am. J. Cardiol.* 55:1463-1465, 1985.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 94.- McGrath, R.B., and Revtyak, G.: secondary myocardial injuries. *Crit. Care Med.* 12:1024, 1984.
- 95.- Alderman, E.L., Matlof, H.J., Shumway, N.E., and Harrison, D.C.: Evaluation of enzyme testing for the detection of myocardial infarction following direct coronary surgery. *Circulation* 48:135, 1973.
- 96.- Guadalajara, J.F.: *Cardiología; Cardiopatía Isquémica*, 4a edición, editorial Mendez Cervantes, 879-ss, 1994
- 97.- Lynnel L., Johnson M.D., Davis W., Seldin, Lewis C., Becker, Norman D., LaFrance, Henry A., Liberman. : Antimyosin Imaging in Acute Transmural Myocardial Infarction Results of a Multicenter Clinical Trial, *JACC*, 13, No1, 27-35, 1989.
- 98.- Akira M., Chuichi K., Takehiko Y., Tomoko O., Shigeru M., Nagara T., Yuji W., Yoshiharu Y., Keigo E., Junji K., and Akira Y.; Mechanism and Significance of myocardial Uptake of anti-myosin antibody in Myocarditis and Cardiomyopathy *Clinical and Experimental Studies.* 68:, No2, august, 215-219, 1993.
- 99.- Bruno FP, Cobb FR, Rivas F, Goodrich JK.: Evaluation of ^{99m}Tc-stannous pyrophosphate as an imaging agent in acute myocardial infarction. *Circulation.* 54:71-78, 1976.
- 100.- Parkey RW, Bonte FJ, Meyer SL, Atkins JM, Curry GL, Stokely EM, Willerson JT: A new method for radionuclide imaging of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* . 50:540-547, 1974.
- 101.- Corbett JR, Lewis M, Willerson JT, Nicod PH, Huxley RL, Simon T, Rude RE, Henderson E, Parkey R, Rellas JS, Buja LM, Sokolov JJ, Lewis SE.: ^{99m}Tc pyrophosphate imaging in patients with acute myocardial infarction: comparison of planar imaging with single-photo tomography with and without blood pool overlay. *Circulation.* 69:1120-1128, 1984.
- 102.- Khaw B.A., Haber E; Radioimmunochemical imaging of myocardial infarction: utilization of anticardiac myosin antibodies In: Burchiel S. Rhodes B.A., Friedman B, ed. *Tumor Imaging: The Radioimmunochemical detection of cancer* . New York; Masson Publishing. 199, 1981.
- 103.- Ban An Khaw, PH.D.; Herman K.Gold, MD; Tsunehiro Yasuda, MD, Robert C. Leinbach, MD; Machito Kanke, MD; John T. Fallow, MD, PH.D.; Martha Barlai-Kovach, MS, H. William Strauss, MD; Florence Sheehan, MD. and Edgar Haber, MD: Scintigraphic Quantification of Myocardial necrosis in patients after intravenous injection of myosin-specific antibody. *Circulation* 74:No3, 50-508, 1986.
- 104.- Khaw BA, Fallon JT, Beller GA, Haber E.: Specificity of localization of myosin-specific antibody fragments in experimental myocardial infarction: histologic, histochemical, autoradiographic and scintigraphic studies. *Circulation.* 60:1527, 1979.

- 105.- Khaw BA, Gold HK, Leimbach RC, Fallon JT, Strauss HW, Phooha G, Haber E.: Early imaging of experimental myocardial infarction by intracoronary administration of ¹³¹I-labelled anticardiac myosin (Fab)2 fragments. *Circulation*. 58:1137, 1978.
- 106.- Parkey RW, Bonte FJ, Meyer SL, Atkins JM, Curry GL, Stokely EM, Willerson JT: A new method for radionuclide imaging of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*. 50:540, 1974.
- 107.- Lewis SE, Devous MD Sr, Corbett JR, Izquierdo C, Nicod P, Wolfe CL, Parkey RW, Buja LM, Willerson JT.: Measurement of infarct size in acute canine myocardial infarction by single-photon emission computed tomography with ^{99m}Tc pyrophosphate. *Am J Cardiol*. 54:193, 1984.
- 108.- Sheehan FM, Mathey DG, Schofer J, Krebber HJ, Dodge MT: Effect of interventions in salvaging left ventricular function in acute myocardial infarction: a study of intracoronary streptokinase. *Am J Cardiol*. 52:431, 1983.
- 109.- Reyes, M.P., and Lerner, A.M.: Cocksakievirus myocarditis-with special reference the acute and chronic effects. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 27:373, 1985.
- 110.- Shapir O., Wille SA.: Myocarditis in poliomyelitis. *Am. J. Med. Sci*. 203:597,1951
- 111.- Kandolf r., Klingel K., Hertsching h., Canu A., Hohendal C., Zell R., Reimann By., Heim A., McManus BM., Foulis AK., Schoktheiss HP., Edmann E., Riecker G: Molecular studies on enteroviral heart disease: patterns of acute and persistent infections. *Eur. Heart. J*. 12:(Suppl D):49-55, 1991.
- 112.- Jagat, N., Ban An Khaw, P.H.D., G. William, Dec., Jr., M.D., Igor, Palacios, M.D. y col.: Brief Report: Recognition of acute myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *The new England Journal of Medicine*. 328:2, 100-104, 1993.
- 113.- Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. : Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am J. Cardiovasc Pathol*. 1:3-14, 1987.
- 114.- Spodick DH.: Infection and Infarction: acute viral (and other) infection in the onset, pathogenesis, and mimicry of acute myocardial infarction. *Am J. Med*. 81:661-8, 1986.
- 115.- Miklozek CL, Crunpaker CS, Royal HD, Come PC, Sullivan JL, Abel mann WH. : Myocarditis presenting as acute myocardial infarction. *Am. Heart. J*. 1157:768-76, 1988.
- 116.- Paillard F, de Place C, Lebreton H, Mabo P, Almange C, Daubert C.: Acute myocarditis with favourable outcome mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 82:Suppl.III-118. abstract, 1990.

- 117.- Costanzo-Nordin MR, O Connell JB, Subramanian R, Robinson JA, Scanlon PJ: Myocarditis confirmed by biopsy presenting as acute myocardial infarction. *Br. Heart J.* 53:25-9, 1985.
- 118.- Dec GW Jr, Waldman H, Southern JF, Fallon JT, Hutter Am Jr, Palacios IF: Viral myocarditis mimicking acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20:85-9, 1992.
- 119.- Mukhallad A. Mohammad and Malcolm: P-sparrow changes in myosin heavy chain stoichiometry in pig aortic smooth muscle during development. *FEB* 228, Feb.1, 109-112, 1988.
- 120.- Laemmli U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 121.- Bonnie S., Dunlar and Eric, D. Schworler. : *Methods in Enzymology*. Vol. 182,663, 1990.
- 122.- Ban An Khaw, George A. Beller, Edgar Haber and Thomas W. Smith.: Localization of Cardiac Myosin-specific Antibody in Myocardial Infarction. *The Journal of Clinical Investigation* . Vol.58, august , 439-446, 1976.
- 123.- Bradford M. Mario, : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *analytical Biochemistry*. 72:248-254, 1976.
- 124.- Merril C.R., Goldman D., Sedman S.A. and Ebert M.H.: Tinción de plata. *Science* 211:1437, 1981.
- 125.- Engvall E. and Perlman. *Immunochemistry*. 8:871, 1971.
- 126.- Towbin H., Stachelin T. and Gordon J.: Inmunotransferencia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350, 1979.
- 127.- Jesse E. Adams III, MD; Dana R. Abendschein, PhD; Allan S. Jaffe, MD: Biochemical Markers of Myocardial Injury. *Clinical Cardiology Frontiers*. Vol. 88,No2, 750-763, 1993.
- 128.- Thomas D. P. : Assays of Myosin. *Methods in enzymology*.Vol. 85,123-139, 1977.
- 129.- Teru Hayashi, Robert B, Silver Wallace IP: Actin-Myosin interaction. Self-assembly into a bipolar "Contractile Unit". *J.Mol.Biol.* 111,159-171, 1977.
- 130.- Alan G. Weeds and Brian Pope.: Studies on the chymotryptic digestion of myosin effects on the divalent cation on proteolytic susceptibility. *J.Mol.Biol.* 111,129-157, 1977.

- 131.- Simon H. Braat, MD; Chris de Zwaan, MD; Jacobus Teule, MD; Guido Heidendal, MD; Hein J.J. Wellens, MD: Value of Indium-111 Monoclonal Antimyosin antibody for Imaging in acute Myocardial Infarction. *The American Journal of Cardiology*, 60:725-ss, 1987.
- 132.- Khaw BA, Beller GA, Haber E.: Experimental myocardial infarction imaging following intravenous administration of iodine-111 labeled antibody (Fab)₂ fragments specific for cardiac myosin. *Circulation*. 57:743, 1978.
- 133.- Tsunehiro Yasuda, MD; Igor F. Palacios, MD; G. William Dec, MD; John T. Fallon, MD, Ban An Khaw, DHD, and Edgar Haber, MD.: Indium-111 monoclonal antimyosin antibody imaging in the diagnosis of acute myocarditis. *Circulation* 76: No2, 306-311, 1987.
- 134.- Dec GW Jr, Palacios IF, Fallon JT, Aretz MT, Mills J, Lee DC-S, Johnson RA: Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies: Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N. Engl J. Med.* 312:885, 1985.
- 135.- Aretz MT, Billingham ME, Edwards WP, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, Olsen EGJ, Schoen FJ: Myocarditis : a histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1:3, 1986.
- 136.- Khaw BA, Gold HK, Yasuda T, et al.: scintigraphic quantification of myocardial necrosis in patients after intravenous injection of myosin-specific antibody. *Circulation* 74:501-8, 1986.
- 137.- Khaw Ba, Yasuda T, Gold HK, et al. : Acute myocardial infarction imaging with indium-111 labeled monoclonal antimyosin Fab. *J. Nucl. Med.* 28, 1671-8, 1987.
- 138.- Braat SH, de Zwaan C, Teule J, Heidendal G, Wellen HJJ. : Value of indium 111 monoclonal antimyosin antibody for imaging in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 60: 725-6, 1987.
- 139.- Johnson LL, Seldin DW, Becker LC, et al.: Antimyosin imaging in acute transmural myocardial infarction: results of a multicenter clinical trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 13:27-35, 1989.
- 140.- Volpini M, Glubbini R, Gei P, et al. : diagnosis of acute myocardial infarction by indium 111 antimyosin antibodies and correlation with the traditional techniques for the evaluation of extent and localization. *Am. J. Cardiol* 63:7-13, 1985.