

## ULTRAESTRUCTURA MITOCONDRIAL DE LEUCOCITOS EN DOS CASOS DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

Ygory Rodríguez, Altamira Soto, Lourdes Pérez y  
Américo Negrette\*

### RESUMEN

Hemos medido y comparado mitocondrias de leucocitos de sangre humana normal, con mitocondrias de leucocitos provenientes de pacientes con mononucleosis infecciosa.

Encontramos que los diámetros longitudinal y transversal de las mitocondrias de mononucleosis infecciosa, fueron significativamente mayores que los de las mitocondrias no edematosas de los controles. También resultaron mayores las mitocondrias edematosas que las no edematosas de los controles.

Podemos señalar que existe un grado elevado de significación estadística en la frecuencia de edematización mitocondrial de los leucocitos de mononucleosis infecciosa, en comparación con los controles normales; y que el edema corresponde a la cámara interna y no compromete a la cámara externa mitocondrial.

### INTRODUCCION

En diferentes estudios se han determinado varios aspectos de la ultraes-

---

\* Sección de Ultraestructura y Biología Celular, Instituto de Investigación Clínica, Apartado Postal 1151. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

estructura y de las alteraciones de las mitocondrias, tales como edema (2, 10), partículas elementales (7), partículas electrodensas en membranas (11), y otras implicaciones morfológicas (1, 3-6) o fisiopatológicas (9).

En trabajo anterior, hemos hablado de la presencia de mitocondrias edematosas en leucocitos de sangre periférica, en pacientes con mononucleosis infecciosa (8).

Nuestro propósito es determinar si existen modificaciones del tamaño y de la estructura mitocondrial en esta enfermedad, si el incremento de la edematización mitocondrial en la mononucleosis infecciosa tiene significación estadística, y si el edema que se produce en las mitocondrias, se limita a una cámara o se extiende a las dos.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizó sangre periférica (obtenida por punción venosa, en tubos heparinizados) proveniente de dos pacientes con manifestaciones clínica, citología sanguínea característica, y serología positiva para mononucleosis infecciosa (Paul-Bunnell), y de tres personas normales tomadas como controles. Después de separar por centrifugación la capa de leucocitos, se hizo fijación en glutaraldehído al 3% , fijación secundaria y coloración preliminar con tetraóxido de osmio, deshidratación mediante alcohol etílico a concentraciones crecientes y óxido de propileno; y se hizo inclusión en araldita. Se practicaron cortes en ultramicrotomo Porter Blum que fueron colocados en rejillas de 400 huecos y coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo según el método de Venable y Coggeshall (12) y observadas con microscopio electrónico JEM 100-B, a 80 K.V. Las microfotografías electrónicas fueron medidas con un microfotómetro Universal Cambridge.

Se determinó el tamaño de las mitocondrias (diámetros y perímetros), la anchura de la membrana de las crestas, del espacio crestal y de la cámara externa y la frecuencia de edematización mitocondrial.

## RESULTADOS

Los valores promedios obtenidos, expresados en milimicras, fueron los siguientes:

**Diámetro mayor mitocondrial (longitudinal).**- Mononucleosis infecciosa (MI) con edema: 964 mu; sin edema: 766 mu. Sangre humana normal (SHN) con edema: 868 mu, sin edema: 510 mu. Tabla I.

**Diámetro menor mitocondrial (transversal).**- MI con edema: 597 mu; sin edema: 447, SHN con edema: 448 mu; sin edema: 349 mu. Tabla II.

**Perímetro.**- MI con edema: 2444 mu; sin edema: 1943 mu. SHN con edema: 1940 mu; sin edema: 1364 mu. Tabla III.

**Cámara externa.**- MI con edema: 7.86 mu; sin edema: 9.17 mu. SHN con edema: 5.75 mu; sin edema: 6.16 mu. Tabla IV.

**Espacio crestal.**- MI con edema: 9.13 mu; sin edema: 8.45 mu. SHN con edema: 4.40 mu; sin edema: 6.29 mu. Tabla V.

**Membrana de la cresta.**- MI con edema: 9.55 mu; sin edema: 8.67 mu. SHN con edema: 5.45 mu.; sin edema: 6.03 mu. Tabla VI.

**Porcentaje de edematización mitocondrial.**- SHN: de 102 mitocondrias contadas, 5 tenían edema (4,9%). MI: De 194 mitocondrias contadas, 89 tenían edema (45,87%). Tabla VII.

## DISCUSION

Para determinar si las mitocondrias son o no mas grandes en las mononucleosis infecciosa, comparamos el diámetro mayor, el diámetro menor y el perímetro de las mitocondrias, en sangre humana normal (SHN) y en mononucleosis infecciosa (MI).

**Diámetro mayor.**- Las diferencias entre los promedios de tamaño de los diámetros mitocondriales mayores, de los casos de mononucleosis infecciosa, y los casos normales, dieron lo siguiente: al comparar controles (SHN) sin edema con mononucleosis (MI) con y sin edema, resultó haber diferencia significativa a favor de mononucleosis. Y al comparar SHN con edema y SHN sin edema también, resultó ser significativa ( $p < 0.01$ ) a favor de SHN con edema. Tabla I. Gráfico 1.

**Diámetro menor.**- El diámetro menor de las mitocondrias edematosas de MI, es más grande que el de las mitocondrias de SHN (con y sin edema). Comparando entre sí las mitocondrias edematosas y no edematosas, tanto

**TABLA I**

TAMAÑO PROMEDIO DEL DIAMETRO MAYOR –  $\mu$

	Mitocondrias con edema		Mitocondrias sin edema	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
SHN	868	227	510	186
MI	964	591	766	449

$\bar{X}$ : promedio      DE: desviación estándar       $\mu$ : milimicras

**GRAFICO 1**

GRADO DE SIGNIFICACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PROMEDIOS DE TAMAÑO DEL DIAMETRO MAYOR

SHN sin edema	◀	MI sin edema	SHN sin edema	◀	MI con edema
SHN con edema	=	MI con edema	SHN con edema	=	MI sin edema
MI con edema	>	MI sin edema	SHN con edema	▶	SHN sin edema

SHN: Sangre Humana Normal

MI: Mononucleosis Infecciosa

▶ Diferencia con certeza de 99,73%

▷ Diferencia con certeza de 99%

> Diferencia con certeza de 95%

= Diferencia no significativa

en MI como en SHN, resultaron significativamente mayores los diámetros menores de las mitocondrias edematosas. El promedio del diámetro menor de las mitocondrias edematosas de los controles, es prácticamente igual que el de las mitocondrias no edematosas de mononucleosis infecciosa (448 x 447  $\mu$ ). Tabla II. Gráfico 2.

**Perímetro.**- Con los promedios del perímetro de las mitocondrias de los casos de mononucleosis infecciosa y de los controles, obtuvimos lo siguiente: al comparar SHN sin edema, con MI sin edema y con edema, resultó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) a favor de MI; al comparar MI con edema con MI sin edema, resultó una diferencia significativa a favor de MI con edema ( $p = 0.01$ ). Tabla III. Gráfico 3.

Como en las microfotografías de mitocondrias edematosas (Figs. 2 y 3)

**TABLA II**

TAMAÑO PROMEDIO DEL DIAMETRO MENOR –  $\mu$

	Mitocondrias con edema		Mitocondrias sin edema	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
SHN	448	18	349	118
MI	597	328	447	190

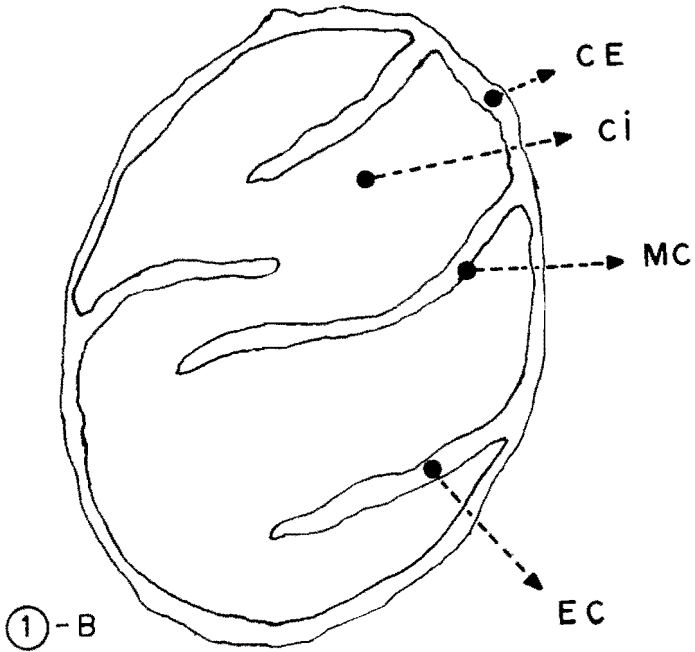
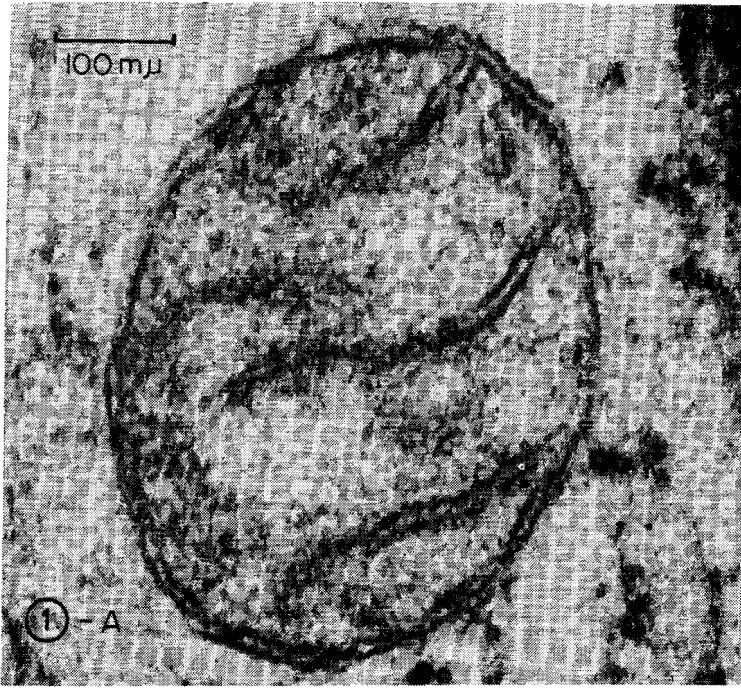
**GRAFICO 2**

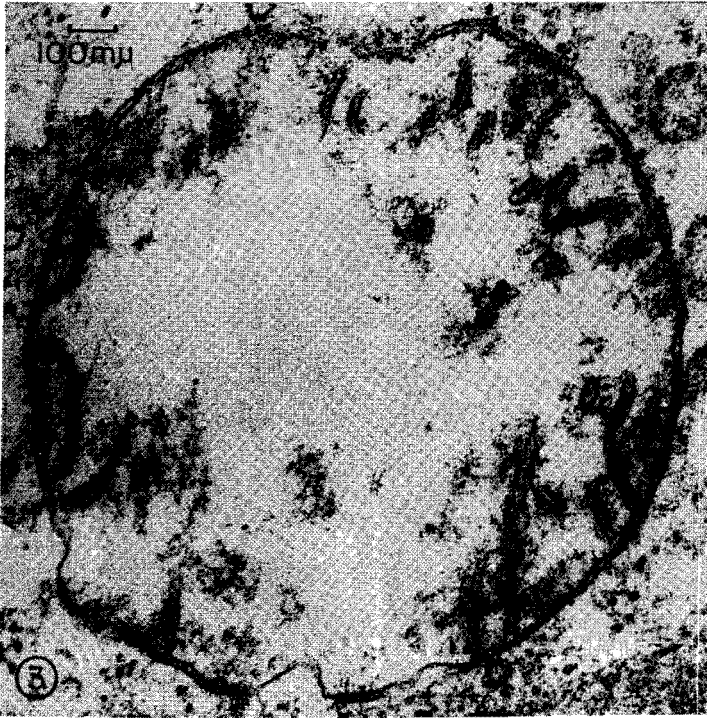
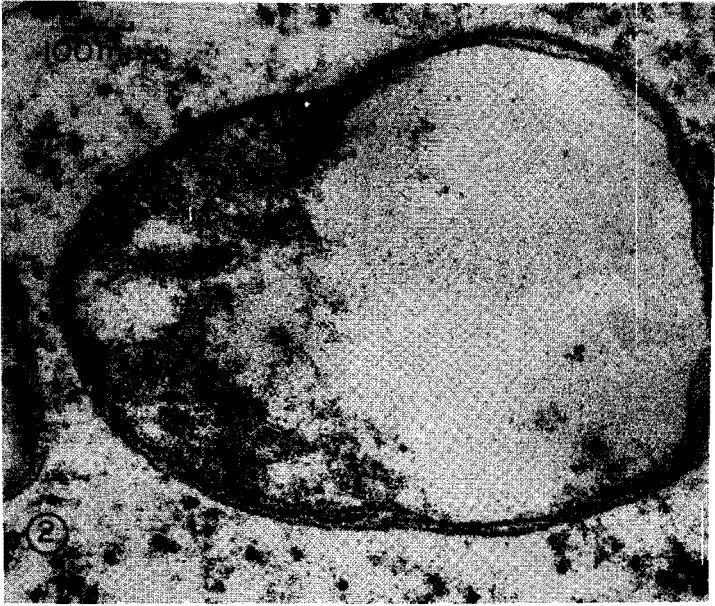
GRADO DE SIGNIFICACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PROMEDIOS DE TAMAÑO DEL DIAMETRO MENOR

SHN sin edema	◀	MI sin edema	SHN sin edema	◀	MI con edema
SHN con edema	◀	MI con edema	SHN con edema	=	MI sin edema
MI con edema	▶	MI sin edema	SHN con edema	▶	SHN sin edema

hemos encontrado que la ubicación del edema corresponde a la cámara interna, realizamos diferentes comparaciones para tratar de precisar si el edema estaba limitado a esta cámara o se extendía a la cámara externa (Figs. 1-A y 1-B).

**Cámara externa.**- Al revisar las diferencias entre los promedios de anchura de la cámara externa mitocondrial de las mitocondrias de mononucleosis infecciosa, en relación con los de las normales, obtuvimos lo siguiente: la cámara externa de las mitocondrias de los leucocitos, en mononucleosis infecciosa, es mayor que la cámara externa de las mitocondrias de los leucocitos de los casos normales. Encontramos también que la cámara externa de las mitocondrias no edematosas, es mayor que la cámara externa de las mitocondrias edematosas (comparando casos normales entre sí y mononucleosis entre sí). Esta diferencia no es significativa desde el punto de vista bioestadístico. Tabla IV. Gráfico 4.





**Fig. 1.— A.- Mitocondria normal. Sangre humana normal. 160.000 X.**

**Fig. 1.— B.- Mitocondria normal: Dibujo esquemático. CE: cámara externa. CI: cámara interna. MC: membrana de la cresta. EC: espacio crestal.**

**Fig. 2.— Mitocondria edematosa. Sangre humana normal. 90.000 X.**

**Fig. 3.— Mitocondria edematosa. Sangre de mononucleosis infecciosa. 60.000 X.**



**TABLA III**

TAMAÑO PROMEDIO DEL PERIMETRO --  $\mu$

	Mitocondrias con edema		Mitocondrias sin edema	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
SHN	1.940	537	1.364	467
MI	2.444	1.331	1.943	988

**GRAFICO 3**

GRADO DE SIGNIFICACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE  
LOS PROMEDIOS DEL PERIMETRO

SHN sin edema	◀	MI sin edema	SHN sin edema	◀	MI con edema
SHN con edema	=	MI con edema	SHN con edema	=	MI sin edema
MI con edema	▷	MI sin edema	SHN con edema	>	SHN sin edema

**Espacio crestal (intracrestal).**- Al estudiar las diferencias entre los promedios de anchura de los espacios de las crestas mitocondriales, encontramos que son mayores en mononucleosis infecciosa (con o sin edema), que en los controles normales (con o sin edema). En las mitocondrias sin edema de los controles normales, la anchura fue significativamente mayor que en las mitocondrias edematosas de los mismos casos. En cambio, en mononucleosis infecciosa las mitocondrias edematosas tienen el espacio crestal algo mayor que el de las no edematosas; aunque la diferencia no fue significativa. Tabla V. Gráfico 5.

**Membrana de la cresta.**- Las medidas obtenidas en las mitocondrias (edematosas o no) de mononucleosis infecciosa, son mayores que las de las mitocondrias (edematosas o no) de los casos normales. En mononucleosis entre sí y en controles normales entre sí (con o sin edema), no hubo dife-

**TABLA IV**

ANCHURA DE LA CAMARA EXTERNA. PROMEDIO EN  $\mu$

	Mitocondrias con edema		Mitocondrias sin edema	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
SHN	5,75	0,91	6,17	1,41
MI	7,86	3,12	9,17	5,08

**GRAFICO 4**

GRADO DE SIGNIFICACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PROMEDIOS DE ANCHURA DE LA CAMARA EXTERNA

SHN sin edema	◀	MI sin edema	SHN sin edema	◀	MI con edema
SHN con edema	◀	MI con edema	SHN con edema	◀	MI sin edema
MI con edema	=	MI sin edema	SHN con edema	=	SHN sin edema

rencia significativa. Cabe observar que la anchura de la membrana de la cresta en las mitocondrias edematosas de los controles fue inferior que la de las mitocondrias sin edema, aunque la diferencia no fue significativa. Tabla VI. Gráfico 6.

Debido a la escasez de mitocondrias edematosas en sangre normal, lo que ocasiona una insuficiente cantidad de mediciones y a las dificultades que presenta la medición de precisión en las membranas de mitocondrias edematosas (límites poco precisos), los valores referentes a cámara externa, espacio de la cresta y membrana de la cresta (membrana interna), deben ser considerados provisionales y no valederos, hasta tanto mediciones más numerosas permitan hacer la confirmación. Tabla VII.

**Porcentaje de edematización mitocondrial.**- La diferencia entre los porcentajes de edematización mitocondrial es: 45,87% (mononucleosis infecciosa) menos 4,9% (sangre humana normal) = 40,97. Esa diferencia es mayor que

**TABLA V**

ESPACIO INTRACRESTAL – ANCHURA PROMEDIO EN  $\mu$

	Mitocondrias con edema		Mitocondrias sin edema	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
SHN	4,40	0,85	6,29	1,50
MI	9,13	4,19	8,45	3,51

**GRAFICO 5**

GRADO DE SIGNIFICACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE  
LOS PROMEDIOS DE ANCHURA DEL ESPACIO CRESTAL

SHN sin edema	◀	MI sin edema	SHN sin edema	◀	MI con edema
SHN con edema	◀	MI con edema	SHN con edema	◀	MI sin edema
MI con edema	=	MI sin edema	SHN con edema	<	SHN sin edema

el error estándar de la diferencia multiplicado por 5 lo que equivale a decir que  $p$  es menor que 0.00001. Por tanto, podemos decir que el grado de edematización mitocondrial de los leucocitos, en nuestros casos de mononucleosis infecciosa, es mayor que en los casos normales tomados como control, con un alto grado de significación estadística.

Las medidas que establecimos en sangre humana normal para membranas externa e interna y para cámara externa, coinciden con las dadas por De Robertis (2); pero las medidas obtenidas en mononucleosis infecciosa son ligeramente más elevadas. Tablas IV, V y VI.

Se ha referido (2) que "en ausencia de ADP, el volumen de la mitocondria puede aumentar de 3 a 5 veces su tamaño normal". No sabemos si este mecanismo está involucrado en el caso del aumento de tamaño de las mitocondrias en nuestros pacientes de mononucleosis infecciosa; pero lo cierto

**TABLA VI**

PROMEDIO DE ANCHURA DE LA MEMBRANA DE LA CRESTA –  $\mu$

	Mitocondrias con edema		Mitocondrias sin edema	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
SHN	5,45	0,96	6,03	1,88
MI	9,55	2,57	8,67	2,93

**GRAFICO 6**

GRADO DE SIGNIFICACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PROMEDIOS DE ANCHURA DE LA MEMBRANA DE LA CRESTA

SHN sin edema	◀	MI sin edema	SHN sin edema	◀	MI con edema
SHN con edema	◀	MI con edema	SHN con edema	◀	MI sin edema
MI con edema	=	MI sin edema	SHN con edema	=	SHN sin edema

es que "la adición de ATP o la reanudación del mecanismo respiratorio, logran la recuperación del tamaño normal. La mitocondria aislada funciona como un osmómetro y en general, desempeña un importante papel en la recuperación o incorporación del agua celular (2)".

"El ión fosfato y el calcio, son productores del hinchamiento mitocondrial. El agua, potasio y sodio, penetran muy rápidamente a través de ambas membranas mitocondriales y pueden producir edema de cámara interna, con dilución de la matriz (2)". Como ésto es lo que ha sucedido en nuestro caso, habrá que tomar en cuenta la posibilidad de este mecanismo patológico. "Además de la fosforilización oxidativa, las mitocondrias cumplen su papel en el transporte activo de agua y iones. La incorporación de agua interfiere la fosforilización oxidativa y ésta se reanuda cuando el agua es eliminada de la mitocondria (2)".

TABLA VII

CANTIDAD DE MITOCONDRIAS Y DE MEDICIONES

	SHN - SE		SHN - CE		MI - SE		MI - CE	
	Mitocondrias	Mediciones	Mitocondrias	Mediciones	Mitocondrias	Mediciones	Mitocondrias	Mediciones
Diámetro mayor	97	97	5	5	105	105	89	89
Diámetro menor	97	97	5	5	105	105	89	89
Perímetro	97	97	5	5	105	105	89	89
Cámara externa	32	32	1	4	62	61	66	66
Espacio crestal	32	32	1	2	62	62	66	66
Membrana de la cresta	32	64	1	4	62	124	66	132
Edematización Mitocondrial	97		5 (4.9%)		105		89 (45.87%)	

SHN: sangre humana normal MI: mononucleosis infecciosa CE: mitocondrias con edema SE: mitocondrias sin edema

Es clara pues la trascendencia del estudio del edema mitocondrial en la mononucleosis infecciosa; puesto que, como hemos visto, el agua en exceso puede llegar a impedir la fosforilización oxidativa, lo que compromete la vida de la célula, Para algunos autores (10) la cámara interna forma un compartimiento bastante rígido, constituido por material resistente a los fenómenos de dilución. Nosotros hemos observado precisamente lo contrario: el edema mitocondrial compromete solamente la cámara interna y determina dilución de la matriz mitocondrial y disrupción de las crestas.

Podemos concluir diciendo que en los leucocitos de nuestros dos casos de mononucleosis infecciosa, existe aumento del tamaño de las mitocondrias e incremento de la edematización mitocondrial; edema que respeta la cámara externa y compromete únicamente la cámara interna mitocondrial.

#### Agradecimiento

A Eufrosina Parra y Manuel Arocha (por su labor técnica); a Eduardo Añez (fotografía), Aurelio Bohórquez (dibujo), Rosario Ramírez, Marina Medrano y Mercedes Chela (secretaría), por su eficiente colaboración.

#### SUMMARY

**Mitochondrial ultrastructure of leukocytes in two cases of infectious mononucleosis.** Rodriguez Y, Soto A, Pérez L, Negrette A (*Instituto de Investigación Clínica, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela*). *Invest. Clín.* 17(2): 97-111, 1976.-We have measured and compared the mitochondrias of the leukocytes in normal human blood, with mitochondrias of leukocytes coming from patients with infectious mononucleosis. We have found that the longitudinal and transversal diameters of the mitochondrias of infectious mononucleosis, were significantly higher than those mitochon-

drias of the controls without oedema. The mitochondrias of the controls with oedema were also higher than those without oedema. We can point out that there exists a significant, statistically elevated grade in the frequency of the mitochondrial oedematization of the leukocytes of infectious mononucleosis, in comparison to the normal controls and that the oedema corresponds to the internal camara and does not compromise itself with the external mitochondrial camara.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AKITSUGU S, MURRAY S, SIDNEY F: Membrane junctions in the intermembrane space of mitochondria from mammalian tissues. *J. Cell Biol* 60: 653-663, 1974.
- 2- DE ROBERTIS E: *Biología Celular*. pp. 175, 187, 190, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 1970.
- 3- HECKER H, BURRI PH, BOHRINGER S: Quantitative ultrastructural differences in the mitochondrium of Pleomorphic bloodforms of *Trypanosoma brucei*. *Experientia* 29: 901-903, 1973.
- 4- HOFFMAN PH, AVERS CH S: Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched per cell. *Science* 181: 749-751, 1973.
- 5- JEAN A: La formation de mitochondries nouvelles dans les spermatoocytes du rat. Fifth International Congress for Electron Microscopy. p. 00-1, Academic Press Inc. New York, 1962.
- 6- LINDEGREN CC, SEARCY RTJ: The anatomy of yeast mitochondrion revealed by electron microscopy of vitally-stained. Squash preparations. *Canc. J. Genet. Cytol* 12: 15-20, 1970.
- 7- MALHOTRA SK, EAKIN RT: A study of mitochondrial membranes in relation to elementary particles. *J Cell Sci* 2: 205-212, 1967.
- 8- NEGRETTE A, RINCON T: Estudio ultraestructural de leucocitos en un caso de mononucleosis infecciosa. *Act Cient Ven* 25 (1): 35, 1974.
- 9- NEGRETTE A: Edema mitochondrial y mononucleosis infecciosa. *Invest Clin* 15(3): 1-2, 1974.
- 10- POLICARD A: *Células vivas y poblaciones celulares*. pp. 97-101. Edit. Labor S.A. Barcelona, 1970.

- 11- STASNY ST, MACHINIST JM, CRANE FL: Surface structure of a whole and sonicated mitochondrial membranes from beef heart. Fifth International Congress for Electron Microscopy. pp 00-2. Academic Press Inc. New York, 1962.
  - 12- VENABLE JH, COGGESHALL R: A simplified lead citrate stain for the use in electron microscopy. J Cell Biol 25: 407, 1965.
-