

## EL NIVEL SANGUÍNEO DE COMPLEMENTO EN LA ASPERGILLOSIS PULMONAR

Ricardo NEGRONI (1)

### RESUMEN

BUDZKO, D. y NEGRONI, R., demostraron recientemente que los extractos endocelulares de *Aspergillus fumigatus* poseen una toxina glucoproteica, termorresistente que inactiva el complemento tanto "in vivo" como "in vitro". Determinamos el nivel de complemento sanguíneo en 45 pacientes portadores de aspergillosis pulmonar, con el objeto de ver si se producían modificaciones del mismo durante ciertos períodos evolutivos de esta afección. Para tal fin empleamos la técnica de KABAT y MAYER y consideramos como normales niveles entre 30 y 50 unidades 50% de hemólisis por ml de suero, determinado en 20 testigos normales. Se observaron complementemias nítidamente elevadas (superiores a 60 unidades/ml) en 25 pacientes y los niveles fueron normales en los restantes enfermos. En 20 pacientes se efectuaron varias determinaciones, comprobando que la complementemia era más elevada cuando presentaban hemóptisis o abundante secreción purulenta. El nivel de complemento más alto de los observados fue de 200 U./ml y el más bajo de 26 U./ml.

### INTRODUCCION

En un trabajo realizado recientemente, NEGRONI & BUDZKO<sup>1</sup>, demostraron que los extractos endocelulares del *Aspergillus fumigatus* poseen una glucoproteína termorresistente que inactiva el complemento tanto "in vivo" como "in vitro". Pensamos que si esta endotoxina era liberada en los pacientes con aspergillosis broncopulmonar, deberían operarse en ellos, al menos en cierto momento de la evolución de su enfermedad, modificaciones del nivel sanguíneo de complemento.

Por otra parte en algunas de las más importantes revisiones<sup>4, 7, 9</sup> sobre las alteraciones del sistema de complemento de enfermedades humanas no presentan información respecto a las micosis profundas.

En el presente trabajo estudiamos el nivel de complemento en personas afectadas por aspergillosis broncopulmonar en diferentes períodos evolutivos.

### MATERIAL Y METODOS

#### 1) Sueros

Estudiamos los sueros de 45 pacientes con aspergillosis broncopulmonar confirmada por estudios serológicos y micológicos, de acuerdo al criterio expresado en un trabajo previo<sup>6</sup>. A 20 de estos enfermos se les dosó complemento en 2 o más oportunidades.

Fueron tomados como testigos 20 personas que no padecían aspergillosis broncopulmonar y sus sueros fueron tratados de la misma forma.

La extracción de sangre se efectuó con jeringa esterilizada en horno Pasteur, con el paciente en ayunas y en tubo seco. La sangre se dejó coagular y para la retracción del coágulo dejamos los tubos durante 2 horas a 37°C, luego se separaron los sueros y

(1) Centro de Micología de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, Argentina.

finalmente fueron guardados hasta el momento del dosaje a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 2) Técnica del dosaje de complemento

### Materiales:

a) Glóbulos rojos de carnero en solución de Alsever.

b) Hemolisina (Difco) glicerina al 50%.

c) Solución buffer de veronal pH 7,2-7,4 según Mayer.

d) La mezcla hemolítica se preparó con volúmenes iguales de una suspensión de glóbulos rojos de carnero conteniendo  $5 \times 10^{-8}$  células por ml y de una dilución de hemo-

lisina equivalente a 4 unidades hemolíticas, en nuestro sistema hemolisina 1/1500. La "standardización" de la suspensión de hemáties fue realizada determinando la concentración de hemoglobina en espectrofotómetro a 540 m $\mu$ . La sensibilización de los hemáties de carnero se obtuvo incubando la mezcla antes mencionada en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante media hora.

### Titulación del complemento (\*)

El día de la prueba se descongelaron los sueros en baño-maría a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego se los colocó en baño de hielo.

Los diversos reactivos fueron agregados en tubos de hemólisis de acuerdo al siguiente protocolo:

Todos los volúmenes son expresados en mililitros.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
Mezcla hemolítica	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Buffer	0,8	0,7	0,6	0,5	0,3	0,1	1,3	—
Agua destilada	—	—	—	—	—	—	—	1,3
Suero del paciente 1/1000	0,5	0,6	0,7	0,8	1	1,2	—	—

En todos los casos empleamos otra serie de tubos con la dilución 1/200 del suero a estudiar y en nuestros pacientes con aspergillosis nos hemos visto precisados a usar, a veces, una tercera serie con la dilución 1/300, debido al alto título de complemento que presentaron.

Todas las operaciones fueron hechas en baño de hielo y una vez completadas, la incubación se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño-maría durante una hora.

Al finalizar la misma se le agregó a cada tubo 2,5 ml de buffer de veronal frío, se los centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos y luego efectuamos la lectura en espectrofotómetro a 540 m $\mu$ . El tubo número 7 fue empleado como blanco y el 8 como testigo de hemólisis total.

De acuerdo a las lecturas confeccionamos gráficos en papel semi-logarítmico, colocando

en las abscisas los valores de Y/1 — y en las ordenadas los volúmenes de suero diluido multiplicados por cinco. Dicha curva proporcionó, por interpolación, el volumen de la dilución de suero que produjo el 50% de hemólisis. Finalmente el resultado fue expresado en número de unidades de complemento 50% de hemólisis por mililitro de suero puro.

Igualmente efectuamos con cada uno de los sueros una titulación rápida del complemento siguiendo la técnica enunciada por KABAT & MAYER<sup>5</sup>.

Dicha prueba fue realizada de acuerdo al siguiente protocolo:

(\*) La técnica empleada es la utilizada por la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.N.B.A.

Tubos	1	2	3	4
Suero 1/50	1 ml	—	1 ml	—
Suero 1/100	—	1 ml	—	—
Buffer	5,5 ml	5,5 ml	6,5 ml	—
Agua destilada	—	—	—	6,5 ml
Mezcla hemolítica	1 ml	1 ml	—	1 ml

Se incubó en baño-maría a 37°C durante una hora. Luego los tubos fueron enfriados en baño de hielo, se los centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos y el grado de hemólisis del sobrenadante fue determinado por lectura espectrofotométrica a 540 m $\mu$ .

Mediante una Tabla tomada del libro de KABAT & MAYER<sup>5</sup> pueden calcularse, conociendo el grado de hemólisis, la cantidad de

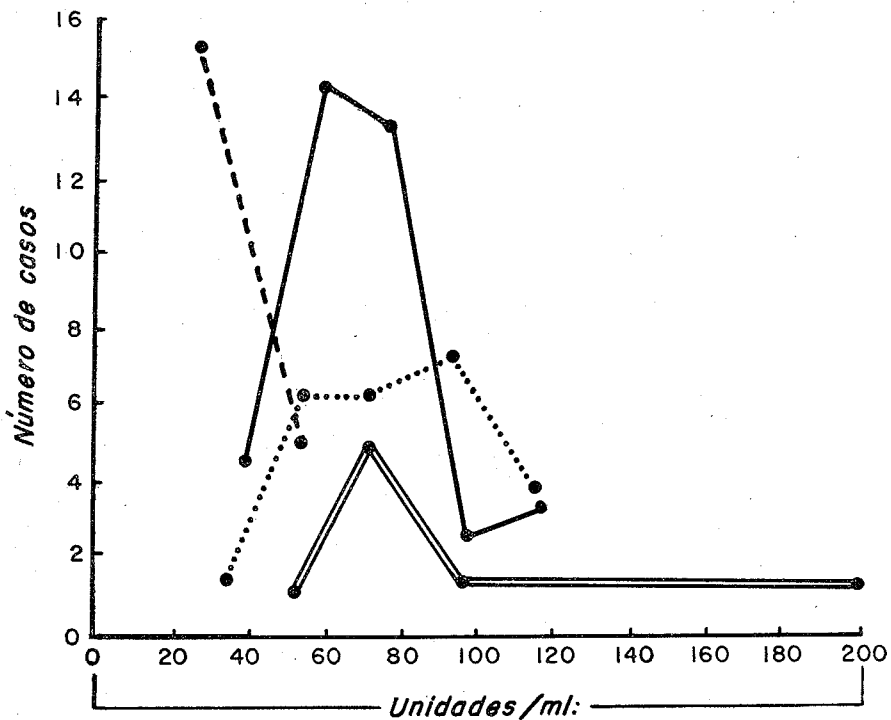
unidades de C' H<sub>50</sub> por ml de suero puro.

Esta técnica fue tomada como control de la titulación anterior.

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos están resumidos en el Gráfico n.º 1. En el mismo puede

GRAFICO N.º 1



- ◆---◆ Sueros normales.
- Aspergillosis intracavitaria.
- .....● Aspergillosis en el momento de la hemóptisis.
- ==● Aspergillosis bronconeumónicas e injertadas en pulmones destruidos.

apreciarse que, de los 20 testigos normales, 16 presentaron niveles de complemento entre 20 y 40 unidades/ml y 4 entre 40 y 55 U./ml. De los 45 pacientes de aspergillosis estudiados, 25 tuvieron complementemias por encima de 60 U./ml, los enfermos portadores de formas bronconeumónicas de aspergillosis o con pulmones destruídos invadidos por *A. fumigatus* exhibieron títulos altos, llegando en un caso fatal, a una complementemia de

200 U./ml. En 22 pacientes pudimos determinar el nivel de complemento en el momento que presentaban hemóptisis comprobando en 15 de ellos nítidas elevaciones por encima de 60 U./ml.

Estos datos fueron sometidos al análisis estadístico mediante el test "T" de Student comprobando un alto grado de significación como lo demuestra el Cuadro I.

CUADRO I

Normales	Aspergillosis intracavitaria	Aspergillosis en pulmón dest.	Aspergillosis muertos	Aspergillosis con hemóptisis
$\bar{X} \pm ES$ 37.7 $\pm$ 1.9 (20)	63.3 $\pm$ 3.4 (33)	84.8 $\pm$ 17.1 (8)	38.4 $\pm$ 10.1 (4)	75.3 $\pm$ 4.5 (22)
P	0,001	—	—	0,001

$\bar{X}$ : promedio

$\pm$ : ES: error "Standard"

Entre paréntesis figura el número total de personas que integraron cada grupo

Como puede apreciarse comparamos el grupo testigo con aquellos integrados por los enfermos con aspergillosis intracavitarias y los sangrados en el momento de la hemóptisis, los otros grupos no fueron comparados por estar compuestos por un pequeño número de pacientes.

#### COMENTARIOS

En los últimos años se ha llegado a la conclusión que el complemento es el principal mediador humoral de las reacciones antígeno-anticuerpo. Posee la capacidad de actuar a la vez sobre las inmunoglobulinas y las membranas celulares. Sobre estas últimas produce diversos efectos tales como modificaciones en su superficie característica, activar enzimas induciendo la aparición de funciones celulares especializadas y finalmente puede alterar la organización macromolecular de las células modificando su estructura y funciones<sup>2, 7</sup>.

Debido a las propiedades biológicas que presenta, su estudio en los fluidos orgánicos, y las causas que inducen modificaciones en su síntesis o su catabolismo han constituido

temas de investigación de gran interés para la patología humana.

Para su detección y cuantificación se emplean diversos métodos tales como la inmunohemólisis (procedimiento empleado en este trabajo); inmunodifusión radial; estudios radioquímicos empleando componentes puros marcados con compuestos radioactivos, estas técnicas permiten el estudio de la síntesis y el catabolismo de los diversos componentes; y la inmunofluorescencia, utilizando antisueros marcados con fluoresceína que permite detectar el depósito de sus diversos componentes, especialmente C<sub>3</sub>, en los tejidos.

Se ha comprobado la participación del sistema complemento en los siguientes fenómenos biológicos: inmunocitólisis, citólisis no inmune, inmunoadherencia, liberación de anafilaxotoxinas, de factores quimiotácticos, efecto opsonizador en la fagocitosis y liberación de histamina y otras quininas.

Según Schur y Austen las enfermedades humanas que cursan anomalías adquiridas del complemento pueden clasificarse como sigue: A) Disminución del nivel de complemento. 1) Aumento de la utilización del complemento: a) por fijación del com-

plemento debida a la precipitación de complejos antígeno-anticuerpo, (lupus eritematoso sistémico, glomérulo nefritis aguda, endocarditis bacteriana subaguda, crioglobulinemias); b) por fijación del complemento por anticuerpos a células o antígenos tesurales (glomérulo nefritis crónica, fluidos articulares de la artritis reumatoidea y anemias hemolíticas). 2) Disminución de la síntesis (glomerulonefritis progresiva y enfermedades hepáticas). B) Elevaciones del nivel de complemento: ictericia obstructiva, tiroiditis, fiebre reumática aguda, artritis reumatoidea, periarteritis nudosa, dermatomiositis, infarto de miocardio agudo, colitis ulcerosa, sarcoidosis, fiebre tifoide, diabetes, síndrome de Reiter y poliartritis agudas.

De acuerdo a las comprobaciones presentadas en este trabajo la aspergillosis broncopulmonar debe ser incluida en este último grupo de enfermedades, cuyo denominador común es la existencia de un intenso proceso inflamatorio. Al respecto señala ROITT<sup>8</sup>, que el consumo de complemento estimula dos características útiles del proceso inflamatorio agudo: la liberación de factores quimotácticos que atraen los polimorfonucleares al lugar de la lesión y la anafilatoxina que aumenta la permeabilidad vascular con el consecuente aflujo de anticuerpos al area afectada. Posiblemente puede haber una unión al sistema fibrinolítico.

La manifiesta elevación observada en los pacientes de aspergillosis durante la hemoptisis y en las formas más graves y difusas, parece indicar que dicha alteración de la complementemia es proporcional a la intensidad de la inflamación.

La determinación del nivel de complemento no permite sacar conclusiones definitivas, pues sólo expresa el equilibrio en un momento dado entre la síntesis de sus diversas fracciones, su catabolismo y su precipitación en los tejidos por fenómenos inmunológicos. De esa manera puede suceder que enfermedades que cursan con consumo acentuado de complemento, tales como la artritis reumatoidea o las infecciones bacterianas, presenten complementemias normales o aumentadas debido a una exagerada síntesis de sus componentes. Esto es lo que probablemente sucede en la aspergillosis.

Estos estudios deben ser completados con determinaciones radioquímicas, que permitan tener una idea de su catabolismo y síntesis. y con estudios de inmunofluorescencia para comprobar si existe o no precipitación de C<sub>3</sub> en los tejidos afectados.

No comprobamos ningún descenso de la complementemia, atribuible a la liberación de la endotoxina del *A. fumigatus*, en nuestros pacientes.

#### SUMMARY

##### *The complement level in pulmonary aspergillosis*

Endocellular extracts of *Aspergillus fumigatus* contain a glucoprotein which is a thermoresistant toxin that inactivates the serum complement either "in vitro" or "in vivo", as it has been recently demonstrated by the Authors. The possibility of a change in the complement level of the sera of patients with lung aspergillosis was investigated as an application of this finding.

The complement level of 20 persons without lung aspergillosis was titrated by the 50% hemolysis technic and by the KABAT & MAYER's technic and values ranging from 30 to 50 U./ml have been found. The complement level was clearly risen (more than 60 U./ml) in 25 of the 45 patients with lung aspergillosis.

The highest titer registered was 200 U./ml and 26 U./ml was the lowest.

Higher complement titer in the sera during hemoptysis or when the patient suffered of abundant bronchial secretion in the course of lung aspergillosis has been demonstrated by repeated titrations.

#### AGRADECIMIENTO

Nuestro reconocimiento al Dr. Felipe Kierszenbaum por su valiosa ayuda en la parte estadística.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BUDZKO, D.B. & NEGRONI, R. — Interacción de extractos endocelulares del hongo

- Aspergillus fumigatus* con el sistema de complemento sérico. Mar del Plata, *Jornadas Argentinas e Inmunología*, 1972.
2. BUDZKO, D.B. — *Curso avanzado de Inmunología e Inmunología química*. Asociación Argentina de Microbiología, 1972.
  3. COOPER, N.R.; POLLEY, M.J. & MULLER-EBERHARD, H.J. — *Biology of Complement*. Scripps Clinic and Research Foundation. Department of Exp. Path., La Jolla, California, 1969.
  4. HANS, J. & MULLER-EBERHARD, H.J. — *Textbook of Immunopathology*. New York, Grune and Stratton, 1971.
  5. KABAT, E.A. & MAYER, M.M. — *Experimental Immunochemistry*. 2.<sup>a</sup> Ed. Springfield, Charles C. Thomas, 1961.
  6. NEGRONI, R.; ROBLES, A.M. & GALUSSIO, J.C. — Estudio comparativo de las reacciones serológicas cuantitativas con un antígeno metabólico de *Aspergillus fumigatus*. *Mycopath. et Mycol. Appl.* 48:275-287, 1972.
  7. ROGER, A. — El complemento; su significación en biomedicina. *Rassegna* 6:23-54, 1973.
  8. ROITT, I. — *Inmunología*. Serie Biomédica. Guanabara, Livraria Atheneu S.A., 1973.
  9. SCHUR, P.H. & AUSTEN, F.K. — Complement in human disease. *Annual Rev. Med.* 19:1-24, 1968.

---

Recebido para publicação em 3/1/1974.