

# Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*

Clara Martínez Manrique, Guillermo Cobas Pupo, ✉ Yamila Lebeque Pérez, Roberto Fontaine Alvarez, Irasema Pérez Portuondo, Humberto Morris Quevedo, Juan Almenares Verdecia

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente. PO Box 4011, CP 90 400, Santiago de Cuba, Cuba. Teléfonos: 53 22 632095; Fax: 53 22 632689; E-mail: ylebeque@cnt.uo.edu.cu

## RESUMEN

Se evaluó la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador, inoculada con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa* por vía subcutánea a ratones Balb/c. Se analizaron indicadores como: título de anticuerpos, conteo de macrófagos peritoneales, formación de granulomas, examen macroscópico del bazo, timo, ganglios linfáticos, hígado, corazón, pulmones, riñones, incluido el peso relativo del bazo y el timo. El título de anticuerpos, durante la respuesta secundaria, resultó superior en los grupos inoculados con CM-95 tratada magnéticamente y alcanzó valores máximos entre 8,12 y 9,84 (2-log), que se diferenciaron significativamente de los controles ( $p < 0,05$ ). El conteo de macrófagos demostró un ligero incremento de estas células en todas las variantes tratadas, excepto en el control con hidróxido de aluminio. Sólo se observaron formaciones granulomatosas en los grupos correspondientes a adyuvantes convencionales. El examen de los órganos no registró variaciones relacionadas con la textura y color de éstos. El aumento del peso del hígado fue superior en las variantes magnetizadas ( $p < 0,01$ ) y en el caso del bazo, sólo fue significativo para el experimento con adyuvante de Freund ( $p < 0,05$ ). Estos resultados aportan conocimientos sobre el efecto de CM-95 en el sistema inmunitario y sugieren su posible uso como adyuvante en las condiciones experimentales ensayadas.

**Palabras claves:** adyuvante inmunológico, antígeno, título de anticuerpos, macrófagos peritoneales, granuloma, tratamiento magnético, *Pseudomonas aeruginosa*, CM-95

*Biotecnología Aplicada* 2003;20:160-163

## ABSTRACT

**Evaluation of magnetically treated CM-95 as immunopotentiator with antigens of *Pseudomonas aeruginosa*.** The immunopotentiating activity of magnetized CM-95 was evaluated with antigens of *Pseudomonas aeruginosa* inoculated subcutaneously to Balb/c mice. Effectiveness was evaluated in terms of antibody titres, peritoneal macrophage counts, presence of granulomas at the inoculation site and macroscopic analysis of organs (spleen, thymus, lymphatic ganglia, liver, heart, lungs, kidneys, including the relative weights of spleen and thymus). Highest antibody titres were reached in the experimental groups treated with CM-95, in which maximum values ranged between 8.12 and 9.84 (2-log units), significantly different from controls ( $p < 0,05$ ). A slight increase in peritoneal macrophages count was shown in all variants treated, except in the aluminium hydroxide control. The presence of granulomas was observed only in groups treated with aluminium hydroxide and Freund's adjuvant. The macroscopic analysis of organs didn't show differences on organs texture and color. An increasing in the liver weight was shown in magnetized CM-95 treatments ( $p < 0,01$ ) and the increasing in spleen weight was only significant in Freund's adjuvant group ( $p < 0,05$ ). These results contribute to the knowledge of CM-95 effects on the immunitary system and suggest its possible use as adjuvant in the assayed conditions.

**Keywords:** immunological adjuvant, antigen, antibody titres, peritoneal macrophages, granuloma, magnetic treatment, *Pseudomonas aeruginosa*, CM-95

## Introducción

La búsqueda de nuevas sustancias con actividad inmunopotenciadora es una vía para lograr mayor calidad y efectividad en la respuesta inmunitaria, lo que se ha demostrado en la obtención de diferentes productos biológicos como sueros policlonales, anticuerpos monoclonales, vacunas, o en su empleo como inmunoestimulantes terapéuticos [1].

Varios científicos han referido resultados alentadores sobre la aplicación del electromagnetismo a sistemas biológicos, lo que ha permitido la obtención de nuevos conocimientos en este campo. Se ha demostrado la sensibilidad del sistema inmunitario al agua, soluciones y entidades biológicas tratadas magnéticamente. Por ejemplo, el agua magnetizada provoca un aumento en el número de linfocitos, lo que pro-

porciona un incremento de la capacidad de defensa del organismo [2].

Otros experimentos realizados en ratas expuestas a campos magnéticos de 25 y 100 Kw/m<sup>2</sup> [3], mostraron variaciones favorables en el número de neutrófilos y linfocitos.

En Cuba, se ha comenzado a trabajar en esta temática con el objetivo de conocer los efectos inmunoestimulantes de sustancias tratadas magnéticamente [1].

Algunas experiencias con el empleo de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente, para la obtención de un sistema diagnóstico anti-Bacillus, han demostrado la eficacia de la misma en el incremento de la producción de anticuerpos [4]. El presente trabajo expone los resultados obtenidos al evaluar la sustancia CM-

1. Martínez C, Pérez I, Infante JF, Sierra G, Delgado L, Cobas G, et al. Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos particulados en ratones de la línea Balb/c por vía intraperitoneal. *VacciMonitor* 1999;11:2-5.

2. Bardasano JL. Bioelectromagnetismo. Ciencia y Salud. Madrid: McGraw-Hill; 2000.

3. Polk CH, Elliot P. Handbook of biological effect of electromagnetic fields. Boston: Ann Arbor; 1990.

4. Martínez CE, Cano B, Cobas G, Pérez I, Hurtado A, Correa M, inventores. Solución Adyuvante. Patente Cubana 22583. 1999.

95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador, con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se utilizaron 80 ratones de la línea Balb/c, de sexo femenino y 6 semanas de edad con un peso corporal de 18-22 g. Los animales fueron suministrados por el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX)<sup>®</sup> Santiago de Cuba. Se emplearon condiciones sanitarias convencionales con una temperatura de  $28 \pm 2$  °C y una humedad relativa entre 60 y 65 %. Los animales se alimentaron con ración suministrada por LABEX<sup>®</sup>, y agua *ad libitum*.

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 8 grupos de 10 animales cada uno. Los 4 primeros grupos correspondieron a los animales de experimentación y se denominaron: GTM1, GTM2, GTM3 y GTM4; los restantes correspondieron a los controles y se denominaron: GSTM, GCN, GCP1, GCP2.

### Preparación de la sustancia adyuvante CM-95

La solución de sales CM-95 fue tratada magnéticamente con un electroimán para sistemas acuosos construido por el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) de Santiago de Cuba. La inducción magnética fluctuó en el rango de 0,01-6T (Tesla) y fue específica para cada uno de los 4 grupos experimentales [4].

### Preparación del Inmunógeno

El inóculo antigénico se obtuvo a partir de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5437 (serotipo 350), donada por el Laboratorio Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Santiago de Cuba.

En los grupos experimentales el inóculo estuvo compuesto por el antígeno microbiano y la sustancia CM-95. Esta última fue tratada magnéticamente con unidades de inducción magnética específica para cada grupo de experimentación como sigue: GTM1 (0,05 T), GTM2 (0,012 T), GTM3 (0,13 T) y GTM4 (0,08 T) [4]. Se espera que en estas condiciones la sustancia CM-95 funcione como adyuvante inmunológico.

Los controles se prepararon de la siguiente manera:

Grupo GSTM: antígeno solo.

Grupo GCN: control sin inocular.

Grupo GCP1: antígeno más el adyuvante hidróxido de aluminio (4 mg/mL) (Behring Werke AG, Germany).

Grupo GCP2: antígeno más el adyuvante completo de Freund (ACF) (Sigma)<sup>®</sup> en la primera dosis y el incompleto (AIF) en la dosis siguiente.

### Esquema de inmunización

Se desarrolló un esquema de inmunización de 50 días, realizando dos inoculaciones subcutáneas cada 15 días, con el antígeno particulado ajustado a una concentración de  $1,5 \times 10^9$  células/mL, y 2 dosis de recuerdo endovenosas los días 25 y 35 del esquema, en los que no se utilizó adyuvante [5]. Todos los grupos de animales de experimentación y controles fueron inoculados con un volumen total de 0,2 mL, donde 0,1 mL correspondió al antígeno y 0,1 mL al adyuvante, excepto en el grupo GSTM, donde el adyuvante fue sustituido por 0,1 mL de solución salina fisiológica

(CINa al 0,9%, Laboratorios Farmacéuticos Oriente, Santiago de Cuba). El antígeno soluble (LPS), obtenido por el método de fenol acuoso [6], se suministró en las dosis de recuerdo, ajustado a una concentración de 200 µg/mL [5].

Los animales se pesaron al comienzo y al final del esquema de inmunización, y en el transcurso del mismo se investigó la formación de granulomas en el sitio de la inoculación, mediante la palpación directa.

### Título de anticuerpos en suero

El suero se obtuvo a través de sangramientos parciales por el plexo retroorbital, cada 7 días. Para la titulación del mismo se realizaron diluciones dobles progresivas en solución salina fisiológica (CINa al 0,9%, Laboratorios Farmacéuticos Oriente, Santiago de Cuba), a partir del suero puro, enfrentándolos al antígeno particulado de la bacteria. El título fue expresado como el inverso de la dilución hasta la cual se observó una reacción positiva de aglutinación en lámina y los resultados referidos como 2-log de los valores correspondientes [7].

Al concluir el esquema de inmunización los animales fueron sacrificados por dislocación de la cervical para el desarrollo de los experimentos restantes.

### Obtención de células peritoneales

Las células peritoneales fueron colectadas mediante lavados de la cavidad peritoneal con 5 mL de PBS-BSA (solución salina tamponada con fosfato pH 7,4) con adición de seroalbúmina bovina (BDH) como suplemento. La suspensión de células resultantes se centrifugó a 1 500 g durante 15 min a 4 °C, en una centrifuga Hitachi (HIMAC) y el precipitado fue resuspendido en un volumen de 100 µl de PBS-BSA, para realizar el conteo de macrófagos en cámara de Neubauer.

### Análisis de los órganos

Se llevó a cabo la disección de los animales y se extrajeron los órganos: bazo, timo, ganglios linfáticos, pulmones, riñones, corazón e hígado, los cuales fueron pesados en una balanza analítica LB-1050 (MIM, Hungría) y examinados macroscópicamente. El peso relativo de los órganos se determinó en base al peso de los animales al final del experimento.

### Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en los diferentes indicadores medidos fueron procesados estadísticamente. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple según diseño completamente aleatorizado, y en caso de que existieran diferencias significativas, se recurrió a la prueba de Rangos múltiples de Duncan para la comparación de medias. El nivel de significación se consideró para  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .

## Resultados y Discusión

Durante el experimento todos los ratones aumentaron de peso y no se registró la muerte de ningún animal. El consumo promedio de alimentos fue similar en todos los grupos de tratamiento. (resultados no mostrados).

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para los 4 grupos experimentales donde se utilizó CM-95 tratada magnéticamente con relación a los controles con adyuvantes convencionales GCP1 (hidróxido

5. Esnard SC, Marrero LM. Tipificación serológica de *Pseudomonas aeruginosa*. Resistencia antibiótica del serotipo predominante. Boletín Epidemiológico 1992; 16 (No 1).

6. Cobas G, Sarmiento R, Martínez C, Snard SC. Aislamiento y separación del LPS de la cepa MP-275 de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Cub Quim 1997; 9 (1): 61-5.

7. Pico MC, Giraldivo IG, Otero A. Inmunología Experimental. La Habana: Editorial Félix Varela; 1997.

de aluminio), GCP2 (adyuvante de Freund) y a los restantes, GSTM y GCN (antígeno solo y control sin inocular respectivamente). Como se observa, en el inicio de la respuesta primaria los valores más elevados se registraron al utilizar el adyuvante de Freund (GCP2), aunque esta sólo mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con relación a la variante GTM3. Se aprecia un aumento progresivo del título de anticuerpos en las variantes GTM2 (donde se usó la sustancia CM-95 tratada magnéticamente) y GCP1, correspondiente al hidróxido de aluminio, que también mostraron diferencias significativas respecto a la variante GTM3, para  $p < 0,05$ . Tras la segunda inoculación a los 15 días, la respuesta secundaria se vio reforzada con un aumento del título de anticuerpos en todos los grupos a excepción del grupo GCN. Esto determinó que entre los días 21 y 35 del esquema existieran diferencias significativas entre cada una de las variantes ( $p < 0,05$ ), con excepción de GTM1 y GTM3 en el día 21. Es importante destacar que en esta etapa los mayores valores correspondieron a los grupos experimentales y de ellas al grupo GTM3, donde se utilizó la mayor y más efectiva de las inducciones magnéticas del rango escogido. En el día 42, excepto los grupos GSTM y GTM4 que exhibieron sus máximos valores de títulos, todos los demás experimentaron un descenso en el valor de anticuerpos. Durante todo el esquema, el grupo GSTM mostró niveles inferiores de título con relación al resto y en el grupo GCN no se registraron valores de título como era de esperar.

La sustancia CM-95 tratada magnéticamente en sus 4 variantes jugó un papel importante en el aumento del título de anticuerpos durante el desarrollo del esquema de inmunización. La respuesta secundaria reforzó los mecanismos fisiológicos de la reactividad inmunológica, como se ha mostrado previamente [1].

Por otro lado, al obtenerse niveles inferiores del título de anticuerpos en la variante GSTM, se demostró que el uso de adyuvantes hace más efectiva la respuesta inmunitaria y que con su empleo se logra un mayor nivel de anticuerpos específicos [8].

El conteo de macrófagos en el exudado de células peritoneales arrojó valores entre 3 y  $4,5 \times 10^6$  células/mL para los grupos donde se utilizó la sustancia CM-95 como adyuvante, sin mostrar grandes diferencias con relación a los controles. No existieron diferencias significativas entre los grupos experimentales pero de ellos, el grupo GTM4 mostró resultados significativos ( $p < 0,05$ ) con relación al control sin inocular y al hidróxido de aluminio (Figura 2).

Aunque la estimulación antigénica por vía subcutánea no está directamente relacionada con los macrófagos peritoneales, se observó una leve estimulación de estas células que corrobora lo planteado sobre la acción inmunopotenciadora de los adyuvantes unidos al antígeno. Los adyuvantes de esta manera, estimulan a los macrófagos y éstos, una vez activados, estimulan la respuesta inmunitaria por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos [8]. Algunos experimentos han mostrado un aumento significativo de macrófagos peritoneales en ratones Balb/c, con relación a los controles, al inocular CM-95 tratada magnéticamente con antígenos de *Bacillus cereus* por vía intraperitoneal [1].

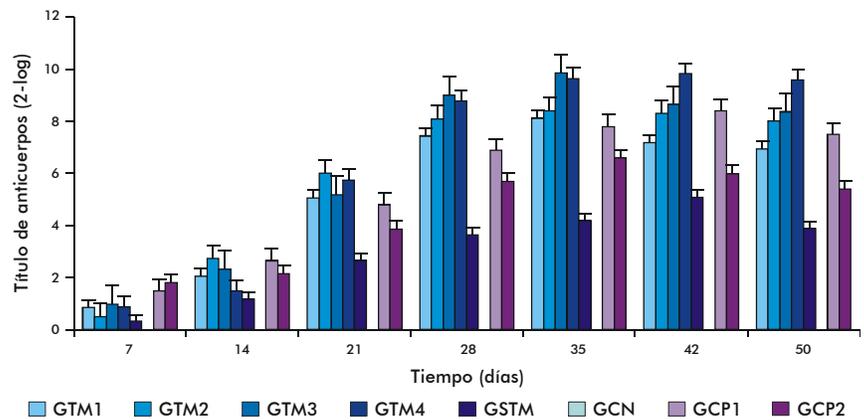


Figura 1. Título de anticuerpos séricos. Los títulos fueron determinados enfrentando diluciones del suero en solución salina 0,9 % con el antígeno particulado de la bacteria, según el método de aglutinación en lámina. Los valores se expresan como la media del 2-log del título  $\pm$  S.E. de 10 ratones. Durante la respuesta secundaria los mayores valores corresponden a los grupos en estudio. Los días 28 y 35 del esquema existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos magnetizados y de ellos con relación a los controles.

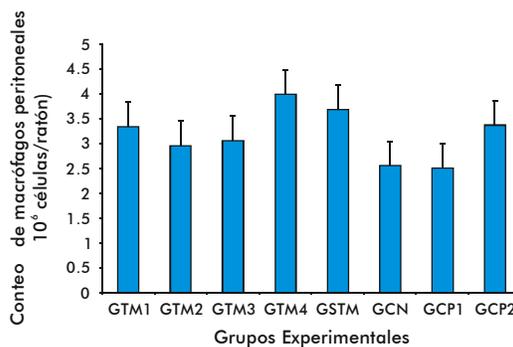


Figura 2. Conteo de macrófagos. El exudado de células se obtuvo mediante lavados de la cavidad peritoneal con PBS-BSA y el conteo se realizó en cámara de Neubauer, después de centrifugar y resuspender las células en PBS-BSA. Los valores son expresados como la media  $\pm$  S.E. de 10 ratones. El grupo experimental GTM4, muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con relación a los controles GCN y GCP1.

Por otra parte, las células fagocíticas se consideran las defensas primarias del organismo contra *Pseudomonas aeruginosa* [9] y la estimulación de macrófagos en el grupo GSTM se explica al valorar la utilización del LPS como antígeno, de quien se informa que además de ser inmunogénico es tóxico, pudiendo inducir la proliferación de macrófagos como resultado de una reacción inflamatoria [10, 11].

No se observó la formación de granulomas en el sitio de la inyección para los grupos cuyo inóculo incluía a la sustancia CM-95 tratada magnéticamente. Sólo donde se inocularon los antígenos preparados con adyuvante de Freund e hidróxido de aluminio, se formaron granulomas, los cuales aumentaron de tamaño en el transcurso de las inoculaciones. Estos resultados se justifican por las características inherentes a estos adyuvantes [12]. En el caso del hidróxido de aluminio se formaron granulomas discretos, coincidiendo con la literatura [13].

La observación macroscópica de los órganos no registró variación morfológica alguna en ninguna de

8. Morris HJ, Martínez C, Abdala RT, Campos D. Adyuvantes Inmunológicos. Rev Cubana Invest Biomed 2000; 18 (2): 130-1.

9. Speert DP. *Pseudomonas aeruginosa*-phagocytic cell interaction. In: Campa M, ed. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. New York: Plenum Press; 1993. p.163-81.

10. Díaz A, Cobas G, Rodríguez Y. Ensayos preliminares para la obtención de una fracción enriquecida con Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* [disertación]. Santiago de Cuba: Univ. Oriente; 1999.

11. Callahan L. Purification and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. Infect. Immun 1974; 9 (1):113-8.

12. Aguilar JC, Leal MJ. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. Biotecnología Aplicada 2000; 17 (3):148-51.

13. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 3ra ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 2000.

los grupos experimentales con relación al control sin inocular, lo cual demuestra la inocuidad de la sustancia CM-95 [1].

El peso de los órganos tuvo diferencias significativas en el caso del hígado ( $p < 0,01$ ), cuyo peso aumentó en todos los tratamientos con relación al control sin inocular. Los mayores valores se registraron en los grupos con CM-95 tratada magnéticamente, mostrando éstos, diferencias significativas en relación a los controles GSTM, GCN y GCP2 (Figura 3).

El comportamiento descrito anteriormente puede explicarse por la activación del hígado al ser sometido a efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente. Anteriormente se ha referido que el tratamiento magnético induce un aumento de la cantidad de RNA de los hepatocitos y un incremento del número y dimensiones de las células de Kupffer [14].

El resto de los órganos (corazón, pulmones, riñones) mostraron valores muy similares que resultaron no significativos.

El peso relativo del bazo sólo presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del grupo GCP2 con relación al resto, exceptuando a los grupos GTM4 y GSTM. Entre los grupos con CM-95 tratada magnéticamente, el GTM4 fue el que exhibió mayores valores, aunque no se diferenció estadísticamente ( $p < 0,05$ ) del resto de los grupos (Figura 4). La mayor reactividad inmunológica en este órgano fue provocada por el tratamiento correspondiente al adyuvante de Freund.

Estos resultados se explican considerando que el bazo responde activamente con la producción de anticuerpos cuando existe estimulación antigénica de sus células plasmáticas [15].

El timo mostró pocas diferencias en cuanto al peso relativo y se encontraron resultados superiores en las variantes donde se utilizó CM-95 tratada magnéticamente con relación al control sin inocular. El peso de los ganglios linfáticos tampoco arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales y controles, aunque se registraron los mayores valores en el grupo GCP2. Los grupos experimentales con CM-95 tratada magnéticamente, mostraron superioridad con relación al control sin inocular (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos en este sentido, mostraron similitud con los referidos en otros experimentos, donde se ha evaluado la sustancia CM-95 [1].

A modo de conclusiones se puede considerar que la magnitud de las inducciones magnéticas con que se trató la sustancia CM-95 fueron efectivas para inducir una fuerte respuesta inmunitaria, expresada en títulos elevados de anticuerpos y valores superiores en el conteo de células del exudado peritoneal, con relación al control sin inocular. No se detectó la formación de granulomas y no se observó la presencia de daños en la arquitectura histológica de los órganos estudiados.

Recibido en noviembre de 2002. Aprobado en septiembre de 2003.

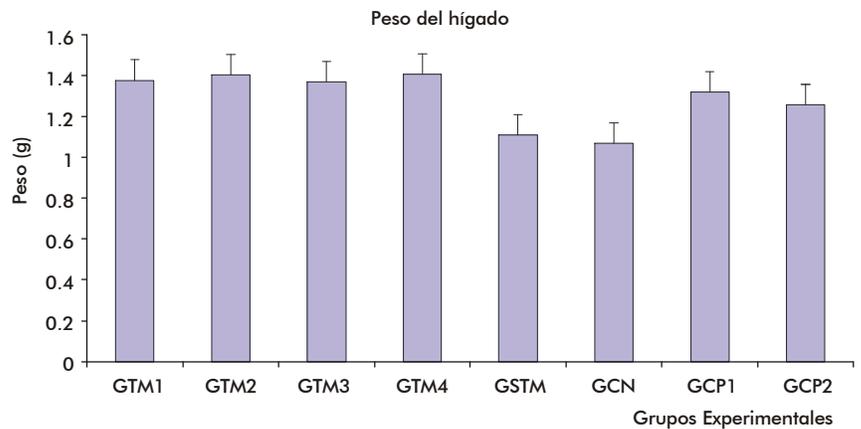


Figura 3. Peso del hígado. Los mayores valores se registran en los grupos con CM-95 tratada magnéticamente, mostrando diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) con relación a los controles GSTM, GCN y GCP2. Los valores son expresados como la media  $\pm$  S.E.

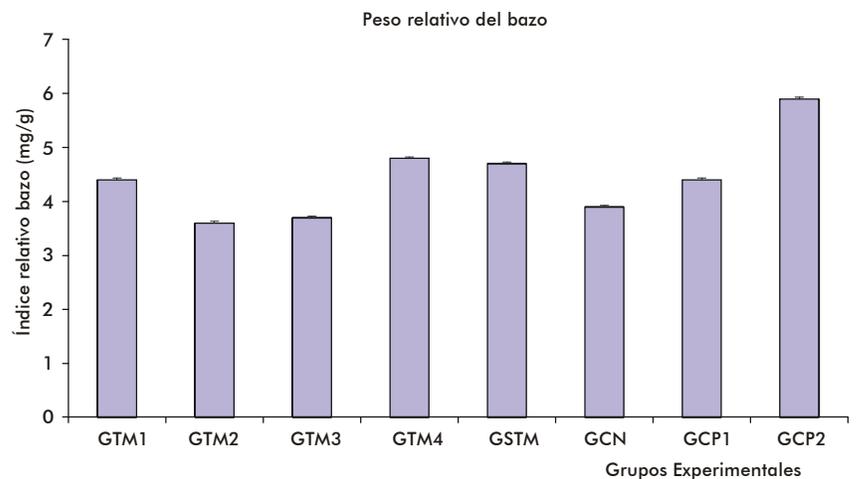


Figura 4. Peso relativo del bazo. Sólo se observan diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en el grupo GCP2 con relación al resto, exceptuando a los tratamientos GTM4 y GSTM. Los valores son expresados como la media  $\pm$  S.E. de 10 animales.

Estas observaciones demostraron la variación de la reactividad de las células del sistema inmunitario, al ser expuestas a los efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente, así como la sensibilidad de los órganos inmunocompetentes ante la acción del campo magnético [3, 16]. Los resultados alcanzados en este trabajo permiten valorar el posible uso de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante en las condiciones experimentales ensayadas y se correspondieron con los resultados de otros investigadores que también reflejaron la acción inmunoestimulante de esta sustancia [4, 16].

14. Krasnow UV, Shilenov AJ. Magneto-therapy of hepatitis A and B in children. *Pediatr* 1991;10:54-7.

15. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby International Limited; 1998.

16. Martínez C, Pérez I, Morris H, Tamayo V, Fontainer R. Efectos de la solución de sales CM-95 tratada magnéticamente sobre diferentes componentes celulares de la respuesta inmune. Resúmenes del II Taller Internacional de Bioelectromagnetismo; 2000 14-17; Santiago de Cuba, Cuba.