

## **Aplicación de la técnica de aclaramiento del carbón coloidal en sangre periférica en la evaluación de la actividad inmunomoduladora de dos productos naturales**

### **Applications of the colloidal carbón clearance technique in peripheral blood in the evaluation of the immunomodulator activity of two natural products**

**Humberto J. Morris Quevedo; Yamila Lebeque Pérez; Gabriel LLauradó Maury; Roberto Fontaine Alvarez; Odalys Rodríguez Gámez.**

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. Cuba.

---

#### **RESUMEN**

En el presente trabajo se evaluó el efecto de dos productos naturales en la actividad in vivo de los macrófagos esplénicos y las células de Kupffer, en diferentes sistemas experimentales, por medio de la prueba de aclaramiento de carbón coloidal en sangre periférica. Los resultados evidenciaron el efecto estimulador de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* 87/1 sobre el sistema monocito-macrófago, administrado como suplemento a ratones malnutridos, y de extractos obtenidos de setas comestibles *Pleurotus* spp. en tres biomodelos de inmunodeficiencias secundarias (inducida por ciclofosfamida, por exposición a radiaciones ionizantes y por malnutrición proteico-energética). En los animales tratados con los productos se observó un menor tiempo de vida media de las partículas de carbón coloidal en sangre, lo que es una evidencia de la actividad inmunopotenciadora de ambos biopreparados y de la aplicabilidad de la técnica en cuestión.

**Palabras clave:** Sistema monocito-macrófago, carbón coloidal, macrófagos esplénicos, células de Kupffer, productos naturales.

---

#### **SUMMARY**

In this paper, the effect of two natural products in the activity in vivo of the splenic macrophages and the Kupffer's cells was evaluated in different experimental systems by means of the colloidal carbon clearance test in peripheral blood. The results evidenced the stimulating effect of a protein hydrolyzate of the microalga *Chlorella vulgaris* 87/1 on the monocyte-macrophagic system, administered as a supplement to malnourished mice, and of extracts obtained from edible mushrooms *Pleurotus spp.* in three biomodels of secondary immunodeficiencies (induced by cyclophosphamide, by exposure to ionizing radiations and by protein-energy malnutrition). In the animals treated with the products, it was observed a shorter time of mean life of the particles of colloidal carbon in blood, which shows the immunopotentiating activity of both biopreparations and of the applicability of the technique.

**Key words:** Monocyte-macrophagic system, colloidal carbon, splenic macrophages, Kupffer's cells, natural products.

---

## INTRODUCCIÓN

El sistema monocito-macrófago constituye la segunda población celular en importancia del sistema inmunitario, y su función principal es la fagocitosis. Los monocitos, una vez que maduran, se convierten en macrófagos que se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos; en el hígado como células de Kupffer y en el bazo como macrófagos esplénicos.<sup>1</sup> Dada la importancia de este sistema en la respuesta inmunitaria, es necesario evaluar su activación cuando se estudian productos naturales con potencial efecto inmunopotenciador. En este sentido, la técnica de aclaramiento de carbón coloidal en sangre periférica, es un índice de la actividad fagocítica, ya que estas partículas administradas por vía intravenosa (i.v) son fagocitadas por los macrófagos residentes en hígado y bazo.<sup>2</sup> En el presente estudio, con el empleo de esta técnica se evaluaron los efectos sobre el sistema monocito-macrófago de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* 87/1, administrado a ratones malnutridos, y de extractos acuosos de setas comestibles *Pleurotus spp.*, administrados a ratones normales y en tres biomodelos de inmunodeficiencias secundarias (inducida por un fármaco, por exposición a radiaciones, y por malnutrición proteico-energética).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon ratones Balb/c de 7-8 semanas de edad y 20-22 g de peso, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX®), Santiago de Cuba.

En la técnica de aclaramiento del carbón coloidal, se administró por vía i.v a través de la vena de la cola a los ratones Balb/c, 0.2 ml de una suspensión consistente en 3 ml de tinta negra Pelikan (AG, Alemania), 4 ml de solución salina fisiológica y 4 ml de solución de gelatina al 3 %. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 ul de sangre, cada 5 minutos, por el plexo retroorbital con capilares heparinizados. La sangre se mezcló con 4 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.1%, y se estimó la concentración de carbón coloidal por lecturas de la absorbancia de las muestras a 675 nm en un espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia-LKB).<sup>3</sup> La velocidad de aclaramiento del

carbón coloidal fue expresada como el tiempo de vida media del carbón en sangre ( $t_{1/2}$ ), calculado por la ecuación:

$t_{1/2} = \ln 2 (t_2 - t_1) / \ln A_1 - \ln A_2$ , donde  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias a los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ , ó mediante la relación de Absorbancias de los grupos respecto al control. En dos casos, se expresó el Índice fagocítico (K), como el inverso del  $t_{1/2}$  del carbón:

$t_{1/2} = 0.693 / k$ ,  $k = 0,693 / t_{1/2}$ .

**Efecto inmunomodulador del hidrolizado proteico:** El hidrolizado proteico (HP) fue preparado por hidrólisis enzimática de la biomasa de *Chlorella vulgaris* con pancreatina (30-45 U/g). Se emplearon 40 ratones Balb/c hembras. Tres grupos fueron sometidos a un período de ayuno hasta la pérdida de aproximadamente el 25 % del peso corporal (M). El grupo (M-DC) luego de la malnutrición, fue alimentado con pienso comercial para la especie durante 8 días de repleción. El grupo (M-HP) fue suplementado, adicionalmente con el hidrolizado por vía oral a razón de 500 mg/kg de peso/día. Al grupo control se le administró dieta convencional durante toda la experimentación.<sup>4</sup> La técnica del carbón coloidal fue realizada al concluir la repleción.

**Inmunodepresión con ciclofosfamida:** El extracto (F-I) se obtuvo a partir del micelio de la seta comestible *Pleurotus spp.* cultivado en medio sólido.<sup>5</sup> Se utilizaron 15 ratones Balb/c machos. Al grupo denominado FI se le administró el extracto a la dosis de 100 mg/kg de peso/día por vía intraperitoneal (i.p) durante 7 días. Al quinto día, además, se administró ciclofosfamida (CY) USP 23 para inyección (10 mg/kg), de JSLYP (China). Al control se le administró salina fisiológica. El día 8 se aplicó la técnica para evaluar la actividad fagocítica.<sup>6</sup>

**Irradiación de cuerpo completo:** El extracto se obtuvo a partir del micelio de la seta por cultivo sumergido.<sup>7</sup> Se emplearon 20 ratones machos y para irradiar se utilizó un aparato Theraton Phoenix (fuente <sup>60</sup>Co), del Hospital Oncológico Provincial "Conrado Benítez" de Santiago de Cuba, se aplicaron dosis de 0.43 Gy/min. Al grupo FI se le administró 0.2 ml del extracto (100 mg/kg) vía i.p. por 7 días; al control se le administró solución salina con la misma frecuencia. El día 6 se realizó la irradiación y al siguiente se aplicó la técnica.

**Malnutrición proteica:** F-I se obtuvo a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus spp.* por fermentación en estado sólido.<sup>8,9</sup> Los grupos experimentales se conformaron de forma similar al experimento desarrollado con el hidrolizado proteico. La duración del período de repleción en los grupos M-DC y M-(FI) fue de ocho días. A la variante M-(FI) se le administró, además, durante la repleción 0.2 ml del extracto (100 mg/kg/día) por vía oral. El octavo día se evaluó la fagocitosis.

**Administración del extracto a dosis única:** Se aplicó una dosis única (100 mg/kg) de extracto de *Pleurotus spp.*<sup>7</sup> Al grupo FI se administró 0.2 mL del extracto por vía i.v, el día 0, mientras, el control se inoculó con 0.2 mL de salina fisiológica.<sup>10</sup> A las 48 h se realizó la evaluación de la actividad fagocitaria.

**Análisis estadístico:** En los experimentos desarrollados en el biomodelo de malnutrición proteico-energética se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple acoplados a la prueba de Duncan para la comparación a

posteriori de las medias de los tratamientos. En las restantes experiencias, la comparación de las medias se realizó mediante la prueba de la t de Student.

## RESULTADOS

**Propiedades inmunofarmacológicas del hidrolizado proteico:** La evaluación de la actividad fagocítica en este experimento, mostró diferencias significativas (p menor 0,05) del grupo tratado con el hidrolizado con relación al grupo alimentado durante la repleción con dieta convencional, dados por un menor tiempo de vida media del carbón en sangre y un mayor índice fagocítico ([figura 1](#)). El comportamiento de este parámetro resultó estadísticamente similar en los ratones que recibieron como suplemento el hidrolizado y el grupo control.

**Efectos inmunomoduladores de los extractos de *Pleurotus spp.*:** En el modelo de inmunodeficiencia iatrogénica (inducida con ciclofosfamida), el tiempo de vida media del carbón en la sangre del grupo tratado con el extracto, fue significativamente menor al del grupo control. También la relación de Absorbancias fue menor en este grupo (p menor 0,05) ([tabla 1](#)).

La evaluación de la acción ejercida por el extracto, sobre el sistema monocito-macrófago de los ratones irradiados, aportó valores superiores en la relación de Absorbancias de los ratones irradiados no tratados con F-I respecto al grupo experimental (p menor 0,05), que recibió dicho extracto como intervención profiláctica ([tabla 2](#)).

En el modelo de restricción dietética, el tiempo de vida media del carbón coloidal fue significativamente menor en el grupo tratado con F-I en relación con el control alimentado con dieta convencional durante el período de repleción (p menor 0,05) ([tabla 3](#)).

Al evaluar el extracto administrado a dosis única en ratones inmunocompetentes, los resultados mostraron una disminución del t $\frac{1}{2}$  y aumento en el índice fagocítico del grupo tratado respecto al control (p menor 0,05) ([tabla 4](#)).

## DISCUSIÓN

Las experiencias de nuestro laboratorio ponen de manifiesto que la técnica aplicada resultó efectiva para evaluar el efecto de los dos productos naturales sobre la fagocitosis, demostrando que los mismos poseen una actividad potenciadora del sistema monocito-macrófago. La administración del hidrolizado estimuló la actividad fagocítica, a juzgar por el comportamiento de los parámetros evaluados. De igual manera, el extracto F-I, potenció la fagocitosis, lo cual fue corroborado por la disminución del tiempo de vida media de las partículas de carbón coloidal en sangre, que es una muestra de la activación de las células de Kupffer y macrófagos esplénicos.<sup>3</sup> El efecto estimulador podría estar dado bien por un incremento en el número de células en el hígado y bazo o por una activación funcional de dichas células. Por ejemplo, el incremento de monocitos en el hígado, procedentes de sangre periférica, unido a un proceso acelerado de diferenciación a macrófagos, se ha propuesto como un mecanismo compensatorio en respuesta a la reducción significativa de células de Kupffer en la malnutrición proteico-energética y en diferentes estados de inmunodeficiencias.<sup>11</sup>

La técnica de aclaramiento del carbón coloidal resulta de fácil ejecución y aplicable por laboratorios convencionales de inmunología. En ella se emplea una solución

elaborada con componentes disponibles en el mercado y la evaluación se realiza en equipos comunes para laboratorios de investigación (fotocolorímetros y/o espectrofotómetros). Esta técnica ofrece información sobre un marcador de una respuesta inmune integrada, al considerar la actividad in vivo de macrófagos. Por otro lado, se caracteriza por una mayor capacidad de procesamiento de muestras, por ser menos laboriosa y susceptible de errores humanos, en comparación con las técnicas convencionales de evaluación de la actividad fagocítica mediante observaciones microscópicas.<sup>12</sup>

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en presente trabajo, a partir de las evidencias del efecto estimulador del sistema monocito-macrófago de dos productos naturales en el tamizaje realizado con la técnica del carbón coloidal en distintos biomodelos in vivo, justifican la ejecución de estudios adicionales para investigar los mecanismos de activación a nivel celular y molecular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología Celular y Molecular. 3. ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill, 2000: 1-214.
2. Yoshizawa Y, Enomoto A, Todoh H. et al. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae *Porphyria yezoensis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993; 57(11): 1862-6.
3. Yoshida I, Kiho T, Usui S, Sakushima M, Ukai S. Polysaccharides in fungi. XXXVII. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biol Pharm Bull* 1996; 19:114-21.
4. Morris HJ, Borges L, Martínez CE, Carrillo O. Restauración de la inmunocompetencia en ratones balb/c malnutridos con la administración i.p. de un hidrolizado enzimático de *Chlorella vulgaris*. *Rev. Cubana. Farm.* [on line] 2003; 37(3) Disponible en: URL: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script> (visitada 24 de noviembre de 2006).
5. Klibansky M, Mansur M, Gutiérrez I. Productions of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on sugar cane agrowastes. *Acta Biotechnol.* 1993; 13:71-8.
6. Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, García N. et al. Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micol. Apl. Int.* 2003; 15(1):7-13.
7. Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Tamayo V, et al. 2002. Preliminar Characterization and Radioprotective effects of aqueous extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. 17 Conf. Química. ISBN: 959-207-0830.
8. Bermúdez RC, Traba J, Verdecia M, Gross P. Producción de *Pleurotus* sp. sobre residuales de agroindustria cafetalera en Cuba. *Micol. Neotrop. Apl.* 1994; 7:47-50.

9. Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol. Apl. Int.* 2001; 13(1): 25-9.
10. Llauradó G, Morris J, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Marcos J, et al. Acerca de la funcionalidad de setas comestibles *Pleurotus spp.*: Propiedades bioestimulantes de un extracto acuoso. *Rev. Cub. Química.* 2005; 17(1): 102-7.
11. Honda Y, Takahashi K, Naito M, Fujiyama S. The role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and proliferation of Kupffer cells in the liver of protein-deprived mice. *Lab Invest* 1995; 72:696-706.
12. Pico MC, López S, Delfin J. Manual de prácticas de inmunología. La Habana. Editorial Pueblo y Educación, 1986.

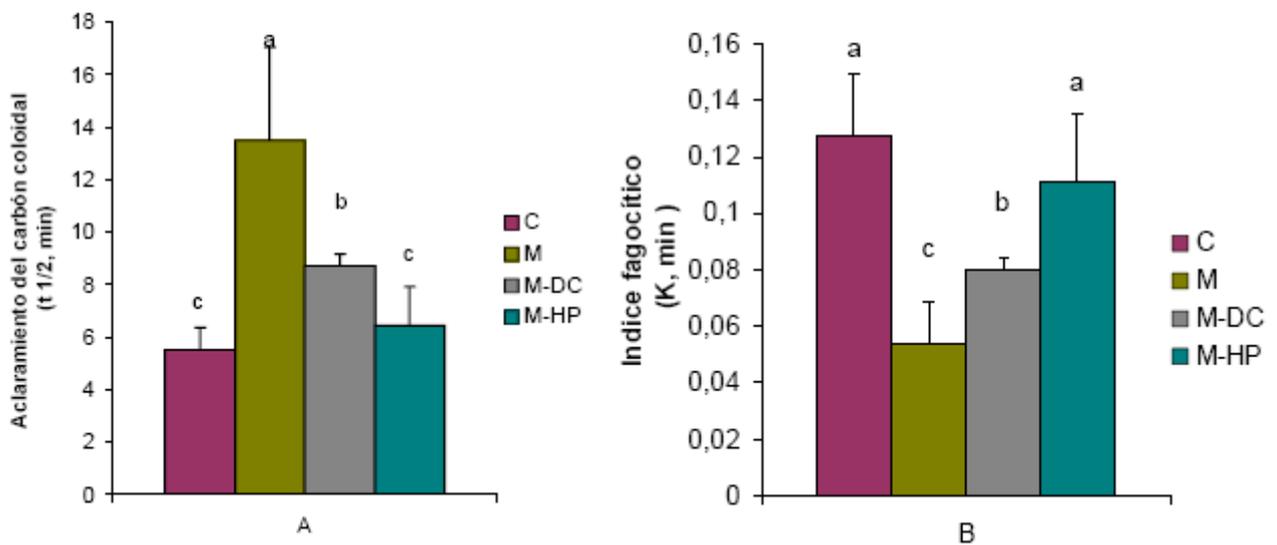
Recibido: 23 de mayo del 2007.

Aprobado: 5 de junio del 2007.

MSc. Humberto J. Morris Quevedo. Ave. Patricio Lumumba s/n, Stgo de Cuba. CP 90 500. Cuba.

E-mail: [hmorris@cebi.uo.edu.cu](mailto:hmorris@cebi.uo.edu.cu)

**Figura 1 Aclaramiento del carbón coloidal en sangre periférica. Tiempo de vida media (A) e Índice fagocítico (B). Ratones malnutridos por restricción alimentaria hasta la pérdida del 25 % del peso corporal (M). Malnutridos y luego alimentados por 8 días con dieta convencional (M-DC). Malnutridos y restituidos con dieta convencional e hidrolizado proteico administrado oralmente (500 mg/kg/día) (M-HP). Control alimentado con dieta convencional durante todo el estudio (C). Todos los valores expresados como la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes significan diferencias significativas respecto al control, ( $P < 0.05$ ) en la prueba de rangos múltiples de Duncan.**



**Tabla 1 Actividad fagocítica en ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida tratados o no con el extracto F-I de *Pleurotus spp.* Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Diferencias significativas \*(P< 0.05) en la prueba de la t de Student.**

Parámetros	FI	Control
t <sub>½</sub> del carbón coloidal (min)	4.23 $\pm$ 1.06 *	6.18 $\pm$ 0.86
Relación de Abs a los 5 min. (A <sub>675</sub> grupos experimentales /A <sub>675</sub> de ratones sin inmunodeprimir)	1.68 $\pm$ 0.33*	1.98 $\pm$ 0.23

**Tabla 2. Aclaramiento del carbón coloidal en los ratones expuestos a radiaciones ionizantes tratados o no profilácticamente con el extracto F-I de *Pleurotus spp.* Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Diferencias significativas \*(P< 0.05) en la prueba de la t de Student.**

Parámetros	FI	Control
Relación de Abs a los 5 min. (A <sub>675</sub> grupo experimental /A <sub>675</sub> de ratones sin irradiar)	1.62 $\pm$ 0.118*	2.01 $\pm$ 0.31

**Tabla 4. Evaluación de la fagocitosis en ratones inmunocompetentes administrados a dosis única por vía i.v con el extracto acuoso de *Pleurotus spp.* Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Diferencias significativas \*(P< 0.05) en la prueba de rangos múltiples de Duncan.**

Parámetros	Control no tratado	FI
Relación de Abs a los 5 min.	0.29 $\pm$ 0.15	0.21 $\pm$ 0.09
t <sub>1/2</sub> (min)	18.30 $\pm$ 1.36	10.11 $\pm$ 1.35*
Índice fagocítico (I)	0.04 $\pm$ 0.001	0.07 $\pm$ 0.01*

**Tabla 3. Aclaramiento del carbón coloidal en ratones malnutridos tratados o no con el extracto F-I de *Pleurotus spp.* durante la repleción. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Diferencias significativas \*( $P < 0.05$ ). en la prueba de rangos múltiples de Duncan.**

<b>Parámetros</b>	<b>M (F-I)</b>	<b>M-DC</b>
Relación de absorbancias a los 5 min. ( $A_{675}$ grupo experimental/ $A_{675}$ del control no expuesto a la restricción alimentaria)	1.4 $\pm$ 0.1*	1.9 $\pm$ 0.1