

# Solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente en comparación con el adyuvante de Freund para la obtención del suero de Coombs en conejo

Clara Martínez<sup>1</sup>, Marlene Toledano<sup>2</sup>, Gustavo Rodríguez<sup>2</sup>, Leagne Andina<sup>2</sup>, Iztiz Lassalle<sup>2</sup>, Gustavo Sierra<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente. Avenida de Las Américas S/N. GP 4078, CP 40900. Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>2</sup> Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales LABEX-CIM. Calle 23 y Carretera del Caney, Reparto Vista Alegre, Santiago de Cuba.

<sup>3</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación–Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba. AP. 16017, CP11600.

**email:** clarita@cnea.uo.edu.cu

---

En este trabajo se evaluó la aplicación de la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico, en comparación con el adyuvante de Freund, para la obtención del suero de Coombs en conejos, de gran demanda en bancos de sangre y hospitales, para el diagnóstico clínico de conflictos Rh y la enfermedad hemolítica del recién nacido, entre otras. Conejos Nueva Zelanda Blancos se inocularon por la vía subcutánea con suero humano obtenido de 30 donantes O<sup>+</sup>, unido con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico. Se empleó un esquema de inmunización de 40 días, donde se evaluó la dinámica en el título de anticuerpos anti IgG humano por la técnica de hemoaglutinación en tubos. Al antisuero se le determinó la calidad inmunológica por el título de heteroaglutininas de los grupos sanguíneos A, B y O, de anticuerpos anticomplemento C3b, C3d y C4b y anti IgG, antes y después de su purificación. El suero de Coombs con la solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente mostró valores similares a los obtenidos con el adyuvante de Freund. En el mismo se cumplió con los requisitos establecidos por el Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos, según las normativas de la FDA para este diagnosticador. Estos resultados abren nuevas perspectivas para el uso de la solución adyuvante en la obtención del suero de Coombs.

**Palabras clave:** Suero de Coombs, solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente, adyuvante de Freund, conejos Nueva Zelanda Blancos.

---

## Introducción

El suero de Coombs es un reactivo biológico de gran demanda en bancos de sangre y laboratorios clínicos para el diagnóstico clínico de conflictos Rh, la enfermedad hemolítica del recién nacido y para la detección rápida o el seguimiento de patologías relacionadas con el sistema inmunológico (1). Para la obtención de estos inmunodiagnosticadores es necesario el uso de los adyuvantes inmunológicos, los que inoculados junto al antígeno hacen más eficaz y duradera la respuesta inmune, al aumentar su inmunogenicidad y por tanto la calidad inmunológica del suero policlonal obtenido. Aún cuando en el ámbito internacional y en Cuba se ha logrado un avance vertiginoso de la biotecnología para la obtención y producción a gran escala de vacunas y diversos bioproductos, la línea de diagnosticadores no presenta el mismo desarrollo. Una limitación importante es la disponibilidad de los adyuvantes inmunológicos, ya que muchos de ellos son eficaces, pero a la vez poco seguros por manifestar diferentes signos de toxicidad.

Numerosos científicos (2) han reportado la sensibilidad de los organismos vivos al campo magnético, por sus efectos biológicos sobre las células del sistema inmune. Existen antecedentes de la investigación científica desarrollada con

la solución de sales CM-95 tratada con campo magnético estático (3), donde se demostró su actividad inmunopotenciadora en biomodelos in vivo e in vitro y su eficacia como adyuvante inmunológico para la obtención de sueros policlonales (4-7).

En este trabajo se ensaya la aplicación de la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico para la obtención del suero de Coombs en conejos de la raza Nueva Zelanda Blancos y la evaluación de los efectos tisulares en el sitio de inoculación al concluir el esquema de inmunización. Los resultados se comparan con el adyuvante de Freund, internacionalmente aplicado como inmunopotenciador para la obtención de este antisuero. Se tienen en cuenta los requisitos establecidos por el Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), según normativas de la FDA y LABEX (8, 9), para evaluar la calidad inmunológica y su funcionamiento como diagnosticador.

## Materiales y Métodos

La metodología y el diseño experimental cumplen con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y lo establecido en las Guías para el Manejo de Animales de Laboratorio, según

el “Internacional Council for Laboratory Animals Science” (10). El protocolo del ensayo realizado se revisó y aprobó por el Comité Institucional de Ética para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y la Unidad de Garantía de la Calidad del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (9).

### **Biomodelo experimental**

Conejos Nueva Zelanda Blancos (NZB), hembras de seis meses de nacidas y peso entre 2 y 2,5 kg, suministrados por el Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB), se mantuvieron en condiciones convencionales: a una temperatura entre  $28 \pm 2$  °C y una humedad relativa promedio entre 60- 65%; se alimentaron con pienso de conejo y agua *ad libitum*.

### **Grupos experimentales**

Se escogieron tres grupos experimentales con cinco conejos NZB cada uno. Los mismos estuvieron conformados por un grupo de tratamiento (GTM), con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico; el grupo control sin tratamiento (GSTM), donde se aplicó la misma solución sin tratamiento magnético como adyuvante inmunológico y otro grupo control positivo (GCP) con el adyuvante de Freund.

### **Preparación del inmunógeno**

A partir de 30 donantes sanos del grupo sanguíneo O<sup>+</sup> se obtuvo una mezcla de suero humano total (SHT) para las inoculaciones durante todo el esquema de inmunización.

### **Preparación de los adyuvantes inmunológicos**

En el grupo GTM se utilizó como adyuvante inmunológico la solución CM-95, formada por una sal inorgánica con los iones cloruro y sodio, a una concentración entre 0,1 y 2% en agua destilada (11). La misma fue sometida al tratamiento magnético en el equipo a imanes permanentes MIPFT, con una inducción magnética en el rango entre 0,01-0,16 T y una velocidad de flujo comprendida en el rango entre 0,1- 0,5 m/s (11). El equipo para el tratamiento magnético fue certificado por el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, según las regulaciones internacionales referidas en el certificado N004-001, Cuba (Avenida de Las Américas S/N Santiago de Cuba 90 400. G.P. 4078. Cuba) La solución una vez tratada magnéticamente se unió al inmunógeno: suero humano total O<sup>+</sup> con volúmenes crecientes en mL, según las exigencias del esquema de inmunización, ajustando la concentración de este a 150 µg /mL (9, 12).

La preparación del adyuvante de Freund en el GCP fue en una mezcla inmunógeno-adyuvante con proporciones de 1:3

respectivamente, con un volumen total de 1 mL para la inmunización de cada animal (9).

### **Inmunizaciones**

Los conejos NZB fueron inmunizados por vía subcutánea en todos los grupos experimentales, con inoculaciones en diferentes sitios del lomo. En los grupos GTM y GSTM se siguió un esquema de inmunización con inoculaciones del antígeno unido a la solución CM-95 tratada y sin tratamiento magnético como adyuvante inmunológico, cada cuatro días durante 20 días, a una concentración de 150 µg con volúmenes crecientes de 1, 1,5 y 2 mL. A los 28 y 36 días se aplicó un refuerzo intravenoso con el antígeno unido a cada solución según el grupo experimental y preparado de igual forma que para las inmunizaciones subcutáneas (7).

Para el grupo GCP con el adyuvante de Freund, el esquema de inmunización contempló dos inoculaciones al tiempo 0 y a los 21 días. Se aplicó un refuerzo por vía intravenosa a los 28 y 36 días del esquema, con el antígeno diluido en solución salina fisiológica en proporción de 1:1 para un volumen total de 1 mL. Ambos esquemas concluyeron a los 40 días.

### **Obtención del suero**

El suero se extrajo por sangramiento parcial en la vena central de la oreja de cada conejo, antes de iniciar el protocolo de inmunización y durante el desarrollo del esquema de inmunización a los 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 días, para determinar su dinámica.

En todos los casos los eritrocitos fueron eliminados por centrifugación a 1800 g, durante 10 min en centrifuga Hitachi (IMAG). Los sueros se conservaron a 4 °C (9).

### **Dinámica en el título de anticuerpos**

Los títulos de anticuerpos anti IgG en los antisueros obtenidos para los grupos GTM, GSTM y GCP durante el esquema de inmunización, se determinaron por la técnica de hemoaglutinación en tubo (13).

Eritrocitos humanos del grupo O<sup>+</sup> de individuos sanos se lavaron tres veces por centrifugación a 1800 g durante 10 min en centrifuga P Selecta (Madifriger, Rusia). Luego se sensibilizaron con el reactivo anti D lote 0601 (CENTIS) en la dilución de 1:16; para ello cada reactivo se añadió en volúmenes de 100 µL. La mezcla obtenida se incubó durante 1 h; después de este tiempo se realizaron tres lavados con salina fisiológica por centrifugación a 720 g durante 10 min. El precipitado obtenido al final de la última centrifugación se resuspendió en SSF al 0,9% (Sigma Aldrich). Posteriormente se hicieron diluciones dobles progresivas en SSF al 0,9% y albúmina al 20% (Sigma) y se enfrentaron a cada antisuero v:v (50 µL). La mezcla antígeno anticuerpo que se obtuvo

para cada dilución se centrifugó a 720 g durante 1 min. El resultado se expresó como 2-log del título de anticuerpos obtenido del inverso de la mayor dilución hasta donde se observó la reacción de aglutinación.

### **Efectos tisulares de los adyuvantes en el sitio de inoculación**

Para conocer los efectos tisulares en el sitio de inoculación con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico, en comparación con la misma solución sin tratamiento magnético y el adyuvante de Freund, se hizo la observación del tejido de forma macroscópica y microscópica. Para la observación macroscópica en los animales de cada grupo se describieron las características observadas a simple vista en el tejido de inoculación, una vez concluido el esquema de inmunización. Para la observación microscópica (14) los tejidos pertenecientes al sitio de inoculación subcutáneo del lomo de cada conejo, donde se practicaron las inmunizaciones, se colectaron en frascos de boca ancha de color ámbar que contenían solución amortiguadora de formalina al 10% (MEDICUBA), las primeras 24 h; luego se transfirieron a una solución menos concentrada al 4% para su conservación. Los tejidos fijados se procesaron en el Histoquinete (Modelo LEYCA-2000, Alemania) y se incluyeron en parafina. Los cortes obtenidos se colorearon con Hematoxilina Eosina (HE) al 10% (BDH). La observación microscópica se realizó en un microscopio Olympus (DMLB- CH2- USA) en inmersión con diferentes aumentos (I02 M07).

### **Purificación de los antisueros**

Los antisueros obtenidos al final de cada esquema de inmunización para los grupos experimentales GTM, GSTM y GCP, luego de su inactivación a la temperatura de 56 °C, en baño termostático BAAM-0 (Retomed, Cuba) se sometieron a un proceso de purificación. El fraccionamiento se realizó por cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE Sephadex A-50 (Amersham Biosciences) en un equipo de cromatografía líquida de baja presión (LKB Pharmacia, Suiza) a la longitud de onda de 280 nm. Las proteínas fueron eluidas con el uso del amortiguador fosfato salino pH 7,2 a un flujo de 12 cm/h. La concentración de proteínas totales presentes en cada fracción colectada se determinó por el método de Lowry (9) y con el uso de un Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Cambridge England). La actividad biológica de los anticuerpos específicos en cada caso se evaluó por la técnica de hemoaglutinación en tubos (8, 9, 13).

### **Determinación de la calidad inmunológica**

La calidad inmunológica de los antisueros obtenidos en cada grupo experimental se determinó teniendo en cuenta los requisitos especiales para el registro de diagnosticadores establecidas por el CECMED, según normativas de la FDA y

LABEX (8, 9) para este diagnosticador. En estos casos se evaluó la especificidad y la potencia inmunológica.

### **Prueba de especificidad**

La prueba de especificidad se realizó al titular las heteroaglutininas de los grupos sanguíneos A, B y O, presentes en los antisueros obtenidos (GTM y GCP). Para ello se aplicó la técnica de hemoaglutinación en tubo. Se mezclaron suspensiones al 5% de los eritrocitos de cada grupo sanguíneo en SSF al 0,9%, con diluciones dobles progresivas de los antisueros a las temperaturas de 4, 20, 30 y 37 °C, con un tiempo de incubación de 30 min, para determinar el grado de aglutinación y la presencia o no de hemólisis. Las mezclas obtenidas se centrifugaron durante 1 min a 720 g. El título de heteroaglutininas se expresó como el inverso de la mayor dilución hasta que se observó la aglutinación.

### **Determinación de la potencia inmunológica**

La potencia inmunológica se evaluó según procedimientos establecidos por el CECMED, a través del título de anticuerpos anti IgG, por la técnica de hemoaglutinación, en los antisueros purificados de los grupos GTM, GSTM y GCP (13). Además, se analizó el título de los anticuerpos específicos para las fracciones del complemento C3b, C3d y C4b. La actividad anticomplemento se determinó mediante la inactivación selectiva de hematíes del grupo O<sup>+</sup> con un sistema amortiguador específico para cada una de las fracciones del complemento a titular (C3b C3d y C4d) referido en Walker (13). Los hematíes recubiertos con los fragmentos específicos del complemento se mezclaron en volúmenes iguales con las diluciones dobles progresivas de los antisueros. Estas se centrifugaron a 720 g durante 1 min y luego la lectura del grado de aglutinación se expresó en una escala de 1 a 4 (8, 9).

### **Evaluación del funcionamiento del suero de Coombs**

Para determinar el funcionamiento del suero de Coombs se aplicó la técnica de Coombs indirecta (9). Se tomaron muestras de suero de 17 individuos (VIH negativo, serología negativa, antígenos para hepatitis negativo). Dentro de ellas, tres fueron de pacientes con anemia hemolítica autoinmune: una de donantes Rh<sub>0</sub> (D) negativos inmunizados para la producción anti D y dos de mujeres Rh<sub>0</sub> (D) negativas, aloinmunizadas por embarazos. A un volumen de 100 µL de todas las muestras se le añadieron 50 µL de una suspensión de células O<sup>+</sup> al 2%, lavadas con salina fisiológica 0,9% por centrifugación, a 720 g durante 10 min en centrífuga P Selecta (Madifriger, Rusia). La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h. Luego se realizaron tres lavados bajo las mismas condiciones explicadas anteriormente. A las células se les añadieron dos volúmenes de 100 mL cada uno de suero de Coombs

pertenece al antisero obtenido y en el grupo control con el suero de Coombs de referencia. A través de la lectura microscópica se expresaron los resultados de la aglutinación en una escala de 1 a 4 (8, 9).

### Análisis Estadístico

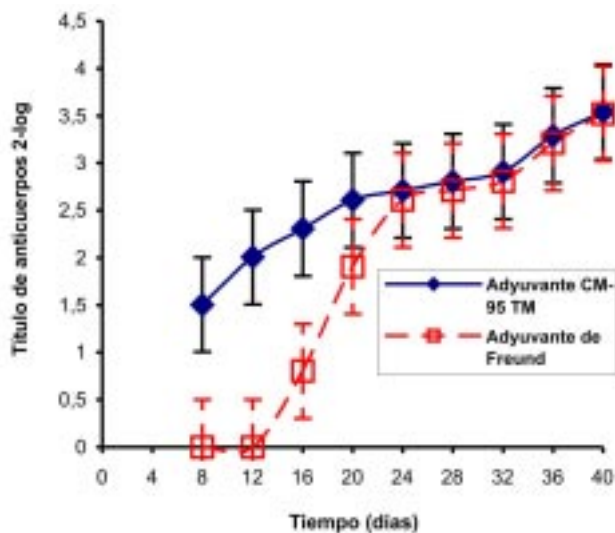
Para comprobar si los datos cumplían una distribución normal se utilizó la prueba de Kolmogorov Smirnov y la de Bartlett para comprobar la homogeneidad de la varianza. Los valores experimentales que se obtuvieron entre los grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de las medias entre los grupos, cuando hubo diferencias significativas entre ellos, se estudiaron con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Todos los cálculos se efectuaron con el auxilio del programa SPSS para Windows, versión 12.0 (2003).

### Resultados y Discusión

#### Dinámica en el título de anticuerpos anti IgG

La dinámica en el título de anticuerpos anti IgG durante los esquemas de inmunización desarrollados en los grupos experimentales GTM y GCP en conejos NZB se exponen en la Figura 1.

Desde el inicio de las inmunizaciones se obtuvieron títulos de anticuerpos inferiores para el esquema donde se utilizó el adyuvante de Freund (GCP), internacionalmente aprobado para estos fines. Sin embargo, la solución CM-95 TM usada como adyuvante inmunológico (GTM) indujo títulos de anticuerpos desde el inicio del esquema, con valores superiores a los obtenidos con el adyuvante convencional hasta el día 24 ( $p < 0,05$ ). A este tiempo estos se igualaron y



**Figura 1.** Dinámica del título de anticuerpos anti IgG con la solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente y el adyuvante de Freund en Conejos NZB n=5.

fueron similares hasta el día 40 ( $p > 0,05$ ), en que finalizaron ambos esquemas de inmunización con títulos de anticuerpos altos. Sin embargo, no se registró ningún título de anticuerpos para el esquema de inmunización donde se aplicó la solución CM-95 sin tratamiento magnético como adyuvante inmunológico, coincidiendo con lo reportado por Martínez y cols. (4, 15). Estos autores señalan que cuando se aplica la misma solución pero sin tratamiento magnético no se evidencian los efectos inmunopotenciadores que se registran con la solución tratada magnéticamente, aunque sean antígenos y esquemas de inmunización diferentes. Por lo que se infiere que los efectos inmunoestimulantes de esta solución en su función como adyuvante inmunológico son potenciados por la acción del campo magnético que recibe. Investigadores como Rodríguez y cols. demostraron modificaciones en las propiedades químico-físicas producidas en la solución CM-95 después de su tratamiento magnético (16). Estos cambios pueden ser responsables del comportamiento diferenciado que adquiere la misma cuando es tratada magnéticamente.

En este trabajo se aplicó un esquema de inmunización que duró el mismo tiempo para ambos adyuvantes, con la misma concentración del inmunógeno y por la misma vía de inmunización. Sin embargo, no hubo coincidencia en el protocolo de inmunización, en la proporción antígeno/adyuvante para cada inoculación y la forma de aplicar el refuerzo, al tratarse de adyuvantes diferentes. Para el refuerzo intravenoso en el grupo GCP no se empleó adyuvante, ya que pudiera obstruir las venas por sus efectos de depósito (17). Sin embargo, fue factible el empleo de esta vía en los restantes grupos con los adyuvantes respectivos. Por otra parte, la solución tratada magnéticamente induce la síntesis de anticuerpos con un mecanismo diferente al reportado para el adyuvante de Freund.

La base de la mayor parte de los procesos biológicos está dada por la interacción de cargas eléctricas presentes en las células de los tejidos biológicos (18). Pero la exposición de los mismos a un campo magnético estático o a soluciones tratadas magnéticamente deberá producir cambios sobre dichos procesos, para lo cual debe existir un mecanismo físicamente plausible que produzca una señal (intensidad del campo) sobre las moléculas cargadas, distinguible del nivel de ruido producido como consecuencia de la actividad biológica del organismo.

Se puede discutir como hipótesis que la solución de sales tratada magnéticamente, al modificar algunas de sus propiedades químico-físicas, podría interactuar con las moléculas cargadas de los antígenos de forma diferente. La nueva mezcla antígeno-adyuvante podría transmitir la señal del campo magnético adquirida, la que mejora las interacciones entre las células presentadoras de antígeno y las células inmunocompetentes, mejor activación de mensajeros secundarios y por supuesto una eficiente activación de los linfocitos para producir los mediadores

solubles que participan también en la compleja red de la respuesta inmune, para la síntesis de los anticuerpos. Todos estos componentes poseen estructuras moleculares cargadas para recibir la señal del campo magnético a través de esta solución.

No obstante, se debe destacar que aunque se propone otro mecanismo de acción para este adyuvante, sus efectos inmunoestimulantes no son diferentes a los obtenidos con adyuvantes convencionales como es el de Freund. Martínez y cols. (4, 5, 15) reportaron la estimulación de macrófagos peritoneales con el uso de la solución CM-95 TM como adyuvante inmunológico con antígenos bacterianos y proteicos y la producción de los isotipos murinos IgG1 e IgG2a para los bacterianos. También la producción de  $INF\gamma$ , citocina mediadora del patrón de respuesta celular que es producida por linfocitos T activados (14). La utilidad de la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico para la obtención de sueros antibacterianos y para la proteína IgG humana es reportado por Martínez y cols. (4, 5, 7, 15), con resultados similares o superiores a los obtenidos con el adyuvante de Freund.

### Efectos tisulares de los adyuvantes en el sitio de inoculación

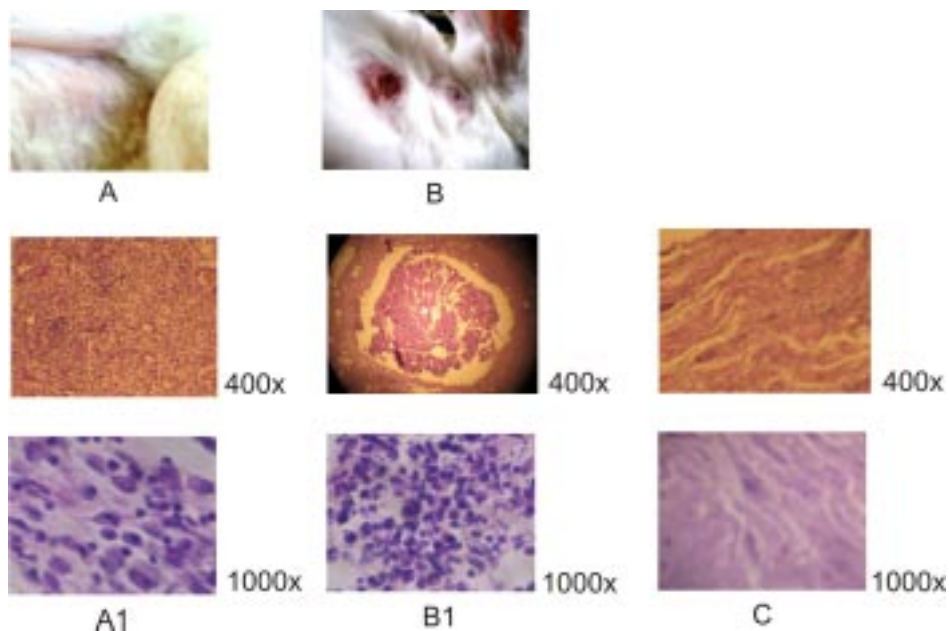
En las Figuras 2A y 2B; 2A1 y 2B1 se muestran los resultados de la observación macroscópica y microscópica, respectivamente, correspondientes a los sitios de inoculación en los grupos GTM y GCP. En los tejidos de inoculación no se observaron lesiones macroscópicas con cambios de coloración cuando se aplicó la solución CM-95 tratada

magnéticamente como adyuvante inmunológico, en contraste con los efectos inflamatorios localizados que se observaron con el adyuvante de Freund en el sitio de inoculación. En este caso se formaron vesículas inflamatorias de 2 a 4 cm con enrojecimiento e induración de la zona tisular.

En la Figura 2A1, se observa tejido fibroadiposo y músculo estriado con infiltrado inflamatorio intersticial moderado, predominio de linfocitos y células plasmáticas, con escaso depósito de material fibrinoide y neutrófilos. No se detecta la formación de vesículas inflamatorias.

En la Figura 2B1, se observa tejido fibrino muscular con infiltrado inflamatorio severo y predominio de neutrófilos, macrófagos (histiocitos), escasos linfocitos y células plasmáticas con neoformación vascular, más congestión y depósitos de material fibrinoide con áreas de pequeñas necrosis, así como la formación de granulomas macrofágicos, propio del mecanismo de acción del adyuvante de Freund. En la Figura 2C, con la solución CM-95 sin tratamiento magnético, se observa predominio de tejido fibroadiposo y músculo estriado sin alteración e infiltrado celular.

La solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico posee un mecanismo de acción que no conduce a procesos inflamatorios severos y localizados, a pesar de estimular la respuesta inmune y lograr la migración de células hacia el sitio de inoculación, efecto que es descrito por la literatura científica para los adyuvantes inmunológicos (19). Sin embargo, el adyuvante de Freund realiza su proceso inmunoestimulante provocando la formación de vesículas macrofágicas, propio de una intensa acción inflamatoria.

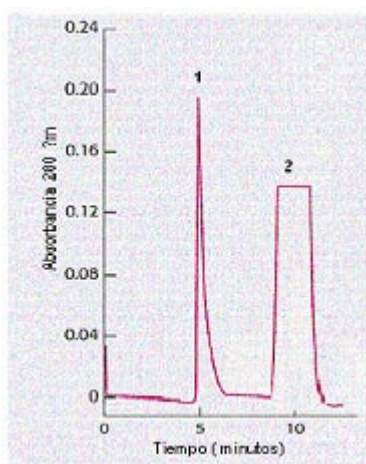


**Figura 2.** Efectos tisulares de los adyuvantes en el sitio de inoculación de los conejos al final de los esquemas de inmunización. Observación macroscópica: (A) solución CM-95 tratada magnéticamente; (B) adyuvante de Freund. Observación microscópica: (A1) solución CM-95 tratada magnéticamente; (B1) adyuvante de Freund; (C) solución CM-95 sin tratamiento magnético. H.E. 400x y 1000x.

## Purificación de los anticuerpos

En la Figura 3 se muestran los resultados del perfil cromatográfico obtenido después de la purificación del suero de Coombs.

En el cromatograma aparecen dos picos simétricos bien definidos, lo que demuestra la resolución del proceso de purificación efectuado a los antisueros obtenidos con ambos adyuvantes inmunológicos. El primero de ellos correspondió a la fracción útil del antisuero y específicamente a la IgG, la cual incluye a los anticuerpos anti IgG y anticomplemento. El segundo pico correspondió a los restantes contaminantes proteicos, como los anticuerpos IgM y entre ellos las heteroaglutininas.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico de la purificación del suero de Coombs obtenido en conejos NZB: la fracción 1 corresponde a los anticuerpos IgG y la fracción 2 a los contaminantes de los sueros.

Los valores del pico útil están dentro del rango permisible de la calidad en la concentración de proteínas, al igual que el de los contaminantes proteicos (Parámetros Normativos LABEX, 2001). A su vez estos valores coinciden con el nivel de anticuerpos específicos y contaminantes determinados para cada antisuero (GTM y GCP).

La concentración total de proteínas antes y después de la purificación de los antisueros se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Proteínas totales en el suero de Coombs antes y después de su purificación.**

Antes de la purificación		Después de la purificación	
Solución CM-95 TM	Adyuvante de Freund	Solución CM-95 TM	Adyuvante de Freund
78,45 mg/mL	80 mg/mL	Pico 1 43,72 mg/mL Pico 2 34,72 mg/mL	41,15 mg/mL 38,79 mg/mL

## Calidad inmunológica del suero de Coombs

Los resultados de la calidad inmunológica del suero de Coombs obtenidos con la solución CM-95 tratada magnéticamente, en comparación con el adyuvante de Freund antes y después de la purificación, se muestran en la Tabla 2. El título de heteroaglutininas antes de la purificación para los antígenos de grupos sanguíneos testados (grupos O, A y B), fueron significativamente inferiores con relación al antisuero obtenido con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico, con respecto al antisuero donde se utilizó el adyuvante convencional de Freund. Después de la purificación los títulos de estas heteroaglutininas fueron negativos, lo cual está acorde con las normativas de la FDA para la producción del suero de Coombs.

**Tabla 2. Resultados de la calidad inmunológica en el suero de Coombs obtenido con el uso de la solución CM-95 tratada magnéticamente en comparación con el adyuvante de Freund.**

Parámetro	O+	A	B	Requisitos establecidos por el CECMED para el suero de Coombs	Suero de Coombs con el adyuvante solución CM-95 TM		Suero de Coombs con el adyuvante de Freund	
					Antisuero	Purificado	Antisuero	Purificado
Presencia de heteroaglutininas	O+			negativo	2	negativo	128	negativo
	A			negativo	8	negativo	64	negativo
	B			negativo	4	negativo	64	negativo
Actividad anti IgG				>= 4	4096	1024	4096	512
Actividad anti C3b				>= 4	X	16	X	4
Actividad anti C3d				>= 2	X	16	X	4
Actividad anti C4b				---	X	4	X	puro



Se conoce que el nuevo adyuvante ensayado (solución CM-95 TM) favorece fundamentalmente la producción de isotipos de anticuerpos IgG, sin embargo, los de la clase IgM por excelencia son los que funcionan como aglutininas de grupo sanguíneo. Todo parece indicar que el adyuvante de Freund indujo en mayor medida la producción de anticuerpos IgM, aumentando el título de las heteroaglutininas. La potencia inmunológica para los anticuerpos anti IgG antes de la purificación arrojó la producción de altos títulos de anticuerpos y a la vez similares entre los dos antisueros, a pesar de haberse utilizado adyuvantes inmunológicos diferentes. Sin embargo, este parámetro sufrió modificaciones después de su purificación, donde los títulos de anticuerpos fueron inferiores para el suero de Coombs obtenido con el adyuvante de Freund, con respecto al de la solución CM-95 TM.

Estas diferencias, pueden explicarse por los títulos superiores de anticuerpos contaminantes (para heteroaglutininas de grupos sanguíneos) presentes en el suero obtenido con el adyuvante de Freund antes de la purificación. Estos pueden tener reacciones cruzadas con los antígenos IgG (antígeno D) presentes en los eritrocitos, en el proceso de titulación de los anticuerpos anti IgG y enmascarar las aglutinaciones específicas con el antígeno D que es la actividad biológica fundamental del suero de Coombs (20).

La actividad de anticuerpos anticomplemento para las fracciones evaluadas después de la purificación de los antisueros (Tabla 2), fue mayor para el obtenido con la solución CM-95 TM con respecto al adyuvante de Freund. Este comportamiento puede indicar que el mecanismo de acción del adyuvante de Freund no favorece de la misma forma la producción de anticuerpos anticomplemento. Esta molécula es más lábil que la molécula IgG y al insolubilizar el antígeno con su liberación lenta (16), puede afectar la actividad biológica y por tanto la producción de anticuerpos específicos. La calidad inmunológica de ambos antisueros, obtenidos con la solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente y el adyuvante de Freund, cumplieron con las normas establecidas para la producción del suero de Coombs (8, 9).

### Funcionamiento del suero de Coombs

En la Tabla 3 se exponen los resultados de la funcionalidad del suero de Coombs obtenidos con la solución CM-95 tratada magnéticamente en muestras de pacientes

sensibilizados con el factor Rh (antígenos D). Los resultados coincidieron en las 17 muestras de suero evaluadas con ambos antisueros, donde 6 fueron positivas y 11 negativas. Sin embargo, en cuanto a la intensidad de los positivos se pueden apreciar pequeñas variaciones, las que no modifican el resultado del diagnóstico obtenido para cada caso. Estos indican la funcionalidad del suero de Coombs obtenido con la solución adyuvante con relación al reactivo comercial.

La solución CM-95 tratada magnéticamente resultó ser, al igual que el adyuvante de Freund, un adyuvante inmunológico eficaz para la obtención del suero de Coombs en conejos Nueva Zelanda Blancos. Sin embargo, el antisuero obtenido con la solución adyuvante mostró niveles inferiores de heteroaglutininas y títulos superiores de anticuerpos anti IgG, anti-C3b y C3d, en comparación con el antisuero que se obtuvo con el adyuvante de Freund. Para ambos antisueros la funcionalidad fue adecuada.

### Referencias

1. Rivero JR, Bencomo HA, Villaescusa BR, Rubio RR. Desarrollo de reactivos biológicos. Una alternativa ventajosa 30 años después. Rev Cubana Hematología Inmunología 1997;12(2). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol12\\_2\\_96/hih10296.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol12_2_96/hih10296.htm).
2. Klasses V. Magnetización de sistemas acuosos. Moscú: Editorial Química; 1982.
3. Martínez CE. Modulación de la respuesta inmune. Tendencias actuales. Revista cubana de Investigaciones Biomédicas 2006;25(4). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002006000400009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002006000400009&lng=es&nrm=iso).
4. Martínez C, Portuondo 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;8(11):2-6.
5. Martínez CE, Cobas G, Lebeque Y, Fontaine R, Pérez I, Morris H, Almenares J. Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. Biotecnología Aplicada 2003;20: 22-5.
6. Martínez CE, Pérez I, Fontaine R, Morris H. Efectos de la Solución CM-95 tratada magnéticamente sobre células mononucleares en ratones Balb/c. Biotecnología Aplicada. 2004 ;21(4):224-8.

**Tabla 3. Funcionamiento del suero de Coombs obtenido con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico en muestras de pacientes sensibilizados con el antígeno D.**

Reactivo suero de Coombs	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6
Antisuero de referencia	3+	3+	2+	2+	2+	3+
Antisuero obtenido	2+	3+	2+	1+	2+	3+

7. Martínez CE, Toledano M, Rodríguez GS, Andina GL, Lasalle I. Solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico en la obtención de antisueros humanos poliespecíficos. Rev. Tecnología Química. Número Especial. 2007;201(3) [en prensa].
8. US Food and Drug Administration. Recommended Methods for Blood Grouping Reagents Evaluation. Docket No. 84S-0181. March, 1992.
9. Expediente maestro del Suero de Coombs. Parámetros Normativos EM.00.011 4ta Edición, LABEX, Cuba; 2007.
10. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Hematology and Clinical Biochemistry Reference Values, In: Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa (Canadá): CCAC Publishing House, 1984; t 1: 86-8.
11. Martínez CE, Rodríguez B, Cobas G, Hurtado A, Pérez I, Correa M. Solución adyuvante. Patente Cubana. 22583,1114.1999. Julio 19.
12. Esnard SC, Marrero ML. Tipificación serológica de *Pseudomonas aeruginosa*. Resistencia a antibióticos del serotipo predominante. Boletín Epidemiol 1992, 1(6):1-6.
13. Walker RH. Technical Manual American Association Blood Banks. 10th. Edition. Aligton VA, American Association Blood Banks. USA; 1999.
14. Martínez CE. Efectos de la solución de sales CM-95 tratada magnéticamente sobre biomodelos *in vitro* e *in vivo*. Potenciación de la respuesta inmune. Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias de la Salud. Santiago de Cuba Universidad de Oriente, 2004.
15. Martínez CE, Tamayo OV, Sierra GG. Obtención del suero anti IgG humano con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico. MEDISAN 2007; 11(4). [artículo en línea]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11\\_4\\_07/san09407.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_4_07/san09407.htm).
16. Rodríguez B, Correa M, Hurtado A. Efectos del tratamiento magnético del agua y Soluciones acuosas. Rev. Cubana de Química 1998;10(1):68-75.
17. Gupta RK, Griffin AC, Chang R, Rivera R, Anderson B, Rots B, et al. The role of adjuvants and delivery systems. In: Scohen and A Shafferman editors. Novel Strategies in Design and Production of Vaccines. New York: Plenum Press; 1996. p.105-13.
18. Fernández MG. Radiaciones no ionizantes. Los campos magnéticos de las líneas de alta tensión y sus posibles efectos sobre la salud y el medio ambiente Memorias del 4to Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear. Tomo IV IRPA 19-24 de Octubre. CIEMAT. Ministerio de la Industria Española y Energía 1998;17(1):7-23.
19. Abbas A K. Lichman AH. Inmunología Celular y Molecular. 3ra Edición. Madrid Interamericana España Mac Graw Hill; 2000.
20. Mautor G D. Reactivos utilizados en la rutina del Banco de Sangre. Disponible en: [www.aatti.com.or/reactivosde-immunohematol.pdf](http://www.aatti.com.or/reactivosde-immunohematol.pdf).

---

## Magnetically-treated CM-95 adjuvant solution compared to Freund adjuvant to obtain Coombs serum in rabbits

### Abstract

This paper assessed the application of the magnetically treated CM-95 solution as immunological adjuvant compared to Freund adjuvant for the obtainment of Coombs serum in rabbits. Among others, Coombs serum is very demanded in blood banks and hospitals for the clinical diagnosis of Rh conflicts and haemolytic disease of the newborn. New Zealand white rabbits were subcutaneously inoculated with human serum, obtained from 30 donors of O<sup>+</sup> blood, together with the magnetically treated CM-95 adjuvant. The immunization schedule was of 40 days and dynamics in the titers of human anti IgG antibodies was assessed by the hemagglutination technique in tubes. The immunological quality of the antiserum was determined by the titers of heteroagglutins from A,B,O blood groups, of anti C3b, C3d and C4d and anti IgG, before and after purification. The Coombs serum with the magnetically treated CM-95 adjuvant solution showed values similar to those of Freund adjuvant. In addition, it meets the requirements of CECMED and FDA established for this diagnostic. These results open new perspectives to the use of the adjuvant Solution in the Coombs serum obtainment.

**Keywords:** Coombs serum, magnetically treated CM-95 adjuvant solution, Freund adjuvant, New Zealand white rabbits.

---

Recibido: Noviembre de 2008

Aceptado: Mayo de 2009