

**Universidad de Oriente  
Facultad de Ciencias Naturales  
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial**

**Efectos de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente sobre  
Biomodelos *in vitro* e *in vivo*. Potenciación de la respuesta inmune.**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud**

**Autor: MSc. Clara Esther Martínez Manrique  
Profesor Auxiliar**

**Santiago de Cuba  
2004**

**Universidad de Oriente  
Facultad de Ciencias Naturales  
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial**

**Efectos de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente sobre  
Biomodelos *in vitro* e *in vivo*. Potenciación de la respuesta inmune.**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud**

**Autor: MSc. Clara Esther Martínez Manrique  
Profesor Auxiliar**

**Tutores: Dr. Gustavo Sierra González Dr. C.  
Profesor Titular**

**Lic. Luis Bergues Cabrales Dr. C.  
Profesor Asistente.**

**Santiago de Cuba  
2004**



*Pensamiento*

*Nuestra libertad y su sostén cotidiano tienen  
color de sangre y están henchido de sacrificio*

### *Dedicatoria*

A la Revolución, que ha permitido mi formación.  
A la memoria de mi padre, a mis dos madres.  
A mis hermanos, en especial a mi hijo y esposo  
que han logrado con su cariño, comprensión y  
ayuda incondicional, que pueda alcanzar metas superiores.

## *Agradecimientos*

A mis tutores, Dr. Gustavo Sierra González, quien siempre me ha brindado de forma abierta y deinteresada los conocimientos y experiencias que posee en este campo de la Ciencia y al Dr. Luis Bergues Cabrales, el que también ha puesto todo su empeño para el desarrollo de este trabajo y me ha transmitido sus experiencias profesionales de forma incondicional.

A los compañeros del CEBI, por la colaboración brindada en todo momento, en especial a los MSc. Irasema Pérez Portuondo, MSc. Humberto Morris Quevedo, Tec. Roberto Fontainer, Lic. Yamila Lebeque, y Dr. Manuel Díaz, entre otros.

A la dirección del Instituto Finlay y a muchos compañeros de este centro, entre ellos a los Drs. Juan Pancho y Sara Catalina Esnard, y los que me apoyaron desde que presenté las primeras ideas de este proyecto a la Lic. Yudith del Campo Alonso quien colaboró en la parte experimental de este trabajo y a la compañera Mayelin Solís Juviel en quien encontré todo el apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Rector Dr. Marcos Cortina, al Vice-Rector de Investigaciones Pedro Beatón y al Director de Relaciones Internacionales Dr. Roberto Sagaró, todos de la U.O., quienes siempre me brindaron su apoyo para la culminación de este trabajo.

Al Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado por su apoyo decisivo y la validación del equipo para el tratamiento magnético que me proporcionaron.

Al Centro de Toxicología de Santiago de Cuba (TOXIMED), en particular al Dr. Alexander Batista y al Dr. Juan E. Betancourt, que hicieron posible llevar a cabo los ensayos inmunotoxicológicos.

A los compañeros del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal y del CREE, de Santiago de Cuba, en particular a la Lic. Juana Heredia que validaron el Kit diagnóstico anti-*Bacillus*.

A la MSc. Vivian Tamayo Ortega y a la Dra. Catalina Suárez Quevedo del Hospital Oncológico Conrado Benítez de Santiago de Cuba, por su colaboración en el desarrollo de ensayos prácticos y la interpretación de los cortes histológicos.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas de Venezuela (I.V.I.C.) por permitirme desarrollar diferentes ensayos prácticos, en especial al Dr. Italo Cesary por sus consejos oportunos.

Al Ing. Benigno Labrada y Lic. Gerardo de la Cruz Licea por su ayuda en el análisis estadístico.

A los compañeros del Dpto. de Biología de la Universidad de Oriente, muchos de los cuales contibuyeron a mi formación profesional.

A los compañeros de la imprenta de la U.O. y a todas aquellas personas que de una forma u otra hicieron posible la realización de este trabajo.

*Muchas gracias.*

## SÍNTESIS

Constituye un reto para la comunidad científica, la búsqueda de nuevas sustancias con actividad inmunopotenciadora, por la necesidad de encontrar aquellas que sean eficaces y seguras, capaces de modificar la respuesta inmune, para su uso en la obtención de sueros mono y policlonales y vacunas, así como en diversos sectores de la inmunoterapia. Por primera vez, en nuestro país y a nivel internacional, se investiga sobre los efectos biológicos e inmunopotenciadores de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente (CM-95 TM) con un campo magnético estático a inducciones magnéticas en el rango de 0,01-0,16 y velocidades de flujo de 0,2 y 0,3 m/s, en biomodelos *in vivo e in vitro*. Los resultados demuestran que los efectos biológicos de la Solución CM-95 TM aceleró el transporte de glucosa en intestino de ratas *Sprague Dawley* y varió de forma significativa el comportamiento de los parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones Balb/c. Estimuló la respuesta inmune humoral con la producción de altos títulos de anticuerpos antibacterianos, al ser inoculada por las vías intraperitoneal, subcutánea e intravenosa, en ratones Balb/c, y por vía intravenosa en conejos Nueva Zelandia Blancos, así como la formación del isotipo murino IgG y las subclases IgG1 e IgG2a, respuestas similares o superiores a la de adyuvantes inmunológicos convencionales. La Solución CM-95 TM potenció la respuesta inmune mediada por células al aumentar el Índice de Estimulación de células mononucleares periféricas, cultivadas *in vitro*; el número de macrófagos peritoneales, por vía específica e inespecífica; la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal y la fagocitosis; además, indujo hipersensibilidad retardada frente a la BSA. La Solución CM-95 TM indujo la secreción de  $INF\gamma$  y no de IL- 5. La evaluación preliminar de la toxicidad e inmunotoxicidad a dosis repetida en ratas *Sprague Dawley* para los parámetros evaluados, demostró una alta tolerancia local y sistémica, para CM-95 TM, con alteraciones de la citoarquitectura celular a nivel de los órganos linfoides, caracterizado por procesos proliferativos. Los resultados obtenidos con la Solución CM- 95 TM aportan nuevos conocimientos sobre la potenciación de la respuesta inmune y su uso de forma novedosa como adyuvante inmunológico para la obtención de sueros antibacterianos. Además, se abren nuevas perspectivas para su aplicación en la inmunoterapia y para la obtención de otros inmunobiológicos.

## INDICE.

	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
	<b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
1.1	Inmunomoduladores	6
1.1.1	Inmunomoduladores inespecíficos	7
1.1.2	Inmunomoduladores específicos	7
1.1.3	Inmunomoduladores. Acción terapéutica	8
1.1.4	Adyuvantes inmunológicos	9
1.1.4.1	Clasificación de los adyuvantes inmunológicos	11
1.1.4.2	Mecanismos de acción de los adyuvantes inmunológicos	12
1.1.4.3	Seguridad de los adyuvantes inmunológicos	13
1.1.5	Evaluación preclínica y toxicológica de los inmunopotenciadores	13
1.1.6	Tendencias actuales en la inmunomodulación	15
1.2	Biomodelos experimentales	16
1.2.1	Tendencias en el uso de biomodelos experimentales	17
1.3	Magnetismo. Características del campo magnético	18
1.3.1	Efectos del campo magnético	21
1.3.2	Aplicaciones médicas del campo magnético	30
	<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
2.1	Tratamiento magnético	31
2.1.1	Equipo para el tratamiento magnético	32
2.1.2	Solución CM-95	32
2.1.3	Grupos experimentales	33
2.2	Biomodelos experimentales	33
2.2.1	Ratones	33
2.2.2	Ratas	33
2.2.3	Conejos	34
2.2.4	Esquema de inoculaciones	34
2.3	Efectos biológicos de CM-5 TM	35
2.3.1	Diseño experimental	35
2.3.2	Transporte de glucosa en intestinos de ratas SPD	35
2.3.3	Tabla 2.3.3 Parámetros bioquímicos y hematológicos	36
2.3.3.1	Inoculaciones	36
2.3.3.2	Obtención del suero	36
2.3.3.3	Ensayos bioquímicos y hematológicos	36
2.4	Respuesta Inmune humoral	36
2.4.1	Diseño experimental	36
2.4.2	Esquemas de inmunización	37
2.4.2.1	Animales	37
2.4.2.2	Preparación de los antígenos	37
2.4.2.3	Adyuvantes	38
2.4.2.4	Inmunizaciones	38
2.4.2.5	Obtención del suero	39
2.4.2.6	Titulación	40
2.4.2.7	Isotipos de anticuerpos	40
2.4.2.7.1	ELISA: isotipo IgG	40
2.4.2.7.2	ELISA: Subclases de IgG	41
2.5	Respuesta Inmune mediada por células	41

2.5.1	Diseño experimental	41
2.5.2	Índice de estimulación CMNPs humanas	42
2.5.2.1	Separación de CMNPs humanas	42
2.5.2.2	Cultivos de células in vitro	42
2.5.3	Macrófagos	43
2.5.3.1	Conteo de macrófagos en el exudado peritoneal	43
2.5.3.2	Actividad de la enzima lisosomal fosfatasa ácida en macrófagos	44
2.5.3.3	Fagocitosis	44
2.5.4	Hipersensibilidad retardada	45
2.5.5	Producción de INF $\gamma$ e IL-5	45
2.5.5.1	Inoculaciones	45
2.5.5.2	Separación de linfocitos	45
2.5.5.3	ELISA de INF $\gamma$ e IL-5	46
2.6	Toxicidad e Inmunotoxicidad	46
2.6.1	Diseño experimental	47
2.6.2	Preparación del producto	47
2.6.3	Inoculaciones	47
2.6.4	Controles realizados	47
2.6.4.1	Signos clínicos	47
2.6.4.2	Peso de los animales	47
2.6.4.3	Índice relativo de baso y timo	47
2.6.4.4	Celularidad de la médula ósea	48
2.6.4.5	Determinaciones hematológicas y bioquímicas	48
2.6.4.6	Estudio anatomopatológico	48
2.6.4.6.1	Necropsia	48
2.6.4.6.2	Ensayo anatomopatológico	48
2.7	Análisis estadístico	49
	<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	50
3.1	Efectos biológicos de CM-95 tratada magnéticamente	50
3.1.1	Transporte de glucosa en ratas SPD	50
3.1.2	Parámetros bioquímicos y hematológicos	51
3.2	Respuesta Inmune humoral	53
3.2.1	Dinámica del título de anticuerpos por vía I.P. en ratones Balb/c	53
3.2.2	Dinámica del título de anticuerpos por vía S.C. en ratones Balb/c	55
3.2.3	Dinámica del título de anticuerpos por vía I.V. en ratones Balb/c	57
3.2.4	Dinámica del título de anticuerpos por vía I.V en Conejos NZB	58
3.2.5	Título de anticuerpos en sueros anti- Bacillus	60
3.2.6	Isotipos de anticuerpos	61
3.3	Respuesta Inmune mediada por células	63
3.3.1	Índice de Estimulación de CMNPs humanas cultivadas in vitro	64
3.3.2	Conteo de macrófagos por exudado peritoneal	64
3.3.3	Actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal	67
3.3.4	Fagocitosis	68
3.3.5	Hipersensibilidad retardada	69
3.3.6	Producción de citocinas	70

3.4	Toxicidad e Inmunotoxicidad	71
3.4.1	Signos clínicos	71
3.4.2	Peso de los animales	72
3.4.3	Peso relativo del timo	73
3.4.4	Peso relativo del baso	74
3.4.5	Celularidad de médula ósea	75
3.4.6	Parámetros hematológicos y bioquímicos	76
3.4.6.1	Conteo total de leucocitos	76
3.4.6.2	Conteo diferencial de leucocitos	77
3.4.6.3	Inmucomplejos circulantes	81
3.4.6.4	Proteínas totales	82
3.4.6.5	Glucosa	83
3.4.7	Estudio anatomopatológico	84
	<b>CONCLUSIONES</b>	98
	<b>RECOMENDACIONES</b>	99
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	100
	<b>BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR</b>	123
	<b>ANEXOS</b>	

## **ABREVIATURAS.**

*AcM: anticuerpo monoclonal.*

*AFC: adyuvante de Freund completo.*

*AFI: adyuvante de Freund incompleto.*

*ATM: agua tratada magnéticamente.*

*BCG: Bacilo Calmette Guering.*

*BSA: albúmina de suero bovino.*

*CEM: campo electromagnético.*

*CME: campo magnético estático.*

*CTL: linfocitos citotóxicos.*

*CMNPs: células mononucleares periféricas.*

*CPA: células presentadoras de antígenos.*

*CM – 95 : Solución de sales*

*CM-95 TM: CM-95 tratada magnéticamente.*

*CM-95 STM: CM-95 sin tratamiento magnético.*

*Cpm: conteo por minutos.*

*CPMP: Comité Proprietary Medicinal Products.*

*EM-ELF: campo magnético de frecuencia extremadamente baja.*

*FDA: Agencia Federal de Estados Unidos para la Administración de Drogas y Alimentos.*

*FNT $\gamma$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa.*

*FA L: fosfatasa ácida lisosomal.*

*GCN: grupo con animales sin inocular*

*GM-CSF: factor estimulante del crecimiento granulocito macrófago.*

*GSTM: grupo con CM-95 sin tratamiento magnético*

*GTM<sub>1</sub>: grupo con CM-95 tratada magnéticamente (0.012 -0.2 m/s)*

*GTM<sub>2</sub>: grupo con CM-95 tratada magnéticamente (0.05 -0.2 m/s)*

*GTM<sub>3</sub>: grupo con CM-95 tratada magnéticamente (0.08 -0.3 m/s)*

*GTM<sub>4</sub>: grupo con CM-95 tratada magnéticamente (0.12 -0.3 m/s)*

*HRT: hipersensibilidad retardada.*

*IA: índice de estimulación.*

*I.D: Intradérmica.*

*I.P :Intraperitoneal.*

*INFx* : interferón  $\alpha$ .

*ISCOMs*: Complejo inmunoestimulante.

*I.V.*: intravenosa.

*LPS*: lipopolisacárido.

*MDP*: muramil dipéptido.

*MF-59*: compuesto de escualeno, Tween 80 y span 85.

*MHC clase I*: Complejo principal de histocompatibilidad clase I.

*MHC clase II*: Complejo principal de histocompatibilidad clase II.

*MPL*: monofosforil lípido A.

*NZB*: Nueva Zelandia Blanco.

*OECD*: Organization for Economic Cooperation and Development.

*PGLA*: poliácido láctico/glicólico.

*PHA*: fitohemaglutinina.

*PIM*: proteína intramembrana.

*PNT*: parámetros normalizados de trabajo.

*QS-21*: fracción del compuesto de Quillaja saponina

*Quil-A*: fracción del compuesto activo de Quillaja saponina.

*SPD*: Sprague Dawley.

*TBS*: solución salina tamponada con albúmina bovina.

*TMD*: trealosa dimicolato.

*TFS*: solución salina tamponada con fosfato.

*Timidina <sup>3</sup>H*: timidina tritiada.

*Th1*: subtipo linfocito T CD4<sup>+</sup>.

*Th2*: subtipo linfocito T CD4<sup>+</sup>.

*TC*: toxina colérica.

*TT*: toxoide tetánico.

*VIH*: virus de la inmunodeficiencia humana.

*VHS*: virus herpes simple.

*VPH*: virus del papiloma humano.

## INTRODUCCIÓN

La Inmunología a nivel mundial ha permitido avanzar en la solución de grandes problemas a la humanidad, uno de ellos es la modulación de la respuesta inmune, a través de la obtención de nuevos fármacos, lo que ha propiciado la terapia en enfermedades de gran impacto social como las bacterianas, virales y parasitarias, incluidas las que producen inmunodeficiencias severas como el SIDA o el cáncer (Morris y col., 2000). Por otro lado, la obtención y aplicación de los adyuvantes inmunológicos, los cuales forman parte importante del desarrollo de la Inmunotecnología, se utilizan en la producción de sueros policlonales y Anticuerpos Monoclonales (AcM) o para lograr la eficacia inmunológica de vacunas humanas y veterinarias (Azuma, 1992; Pico y col., 1997).

Entre los compuestos con propiedades adyuvantes, se han utilizado sustancias químicas como el Hidróxido de Aluminio y el Adyuvante de Freund (AFC y AFI); entre otras, las que poseen gran eficacia, pero a su vez muestran signos de toxicidad (Pico y col., 1997). La tendencia moderna en este campo va dirigida a la búsqueda de sustancias de origen natural; que se obtienen de la diversidad biológica de nuestro planeta, de relativa abundancia y muchos de ellos con niveles inferiores de toxicidad en comparación con los productos químicos (Morris y col., 2000).

Para el uso de inmunopotenciadores, se tiene en cuenta su acción a diferentes niveles de la respuesta inmune, al estimular poblaciones y/o sub-poblaciones de células como linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK, células T citotóxicas (CTL), o la producción de citocinas que median mecanismos importantes de la inmunidad innata y adquirida (Stites, 1985; Stewart, 1989; Morris y col., 2000).

Dentro de los inmunopotenciadores de nueva generación se incluyen las citocinas; las cuales tienen la capacidad de regular y modular la respuesta inmune, por lo que pueden

ser utilizadas para la terapia antitumoral, antiviral, antibacteriana y antiparasitaria, entre otros usos. Entre las citocinas más empleadas por si solas o de forma conjugada podemos mencionar al  $INF\gamma$ , la IL-2, IL-18, IL5, y  $FNT\alpha$ , (Bohn y col., 1998; Salgaller y col., 1998; Fujioka y col., 1999; Luster, 1999; Maestroni y col., 1999, Sugawara y col., 1999; Shung y col., 2000; Dupré y col., 2001). Los glucanos extraídos de hongos y algas constituyen otro grupo importante de sustancias naturales con propiedades inmunoestimulantes, muchas de las cuales ya se utilizan en la terapia antitumoral o se evalúan como adyuvantes inmunológicos (Morris y col., 200; Dantos y col.; 1999; Mary, 2000).

A pesar de los avances tangibles que se han experimentado en este campo, la problemática fundamental se centra en que la mayoría de las sustancias inmunoestimulantes pueden tener efectos tóxicos, que invalidan sus usos en humanos y animales. Por otro lado, requieren de tecnologías complejas para su obtención, haciendo poco costeable su incorporación como productos al mercado. Hoy constituye un reto para la ciencia, la búsqueda de nuevas sustancias con actividad inmunopotenciadora, que propicien la potencia inmunológica, compatibles con las modificaciones experimentadas en las tecnologías de estos productos biológicos, con el uso de antígenos cada vez más pequeños, obtenidos por ADN recombinante o sintéticos. Estos preparados biológicos requieren de potentes adyuvantes que los hagan más inmunogénicos, o que modifiquen la respuesta inmune para vacunas profilácticas o terapéuticas; pero que a su vez sean seguras para su utilización en humanos y animales.

Una línea de investigación va dirigida al uso de campos magnéticos de frecuencias extremadamente bajas (menores a 300 Hz) y estáticos (0 Hz), para la terapia de numerosas enfermedades y el tratamiento de los sistemas acuosos tratados magnéticamente (SATM) también utilizados para el tratamiento de enfermedades en el hombre, como por ejemplo, las digestivas, cicatrización de heridas, urolitiasis, hipertensión arterial, aterosclerosis, fracturas óseas, entre otras (Klassem, 1982).

Diversos estudios reportan que el campo magnético es capaz de producir efectos biológicos *in vivo* e *in vitro*, incluido la sensibilización del sistema inmune, los que son generalmente considerados como inocuos a la salud humana, debido a que sus niveles de emisión de energía están muy por debajo de la requerida para producir daños en el

metabolismo humano (Adey, 1981; Fernández, 1998). Se ha demostrado su inocuidad en estudios epidemiológicos que incluyen evaluaciones toxicológicas, genotóxicas y teratogénicas, entre otras, para campos magnéticos estático y de frecuencias alta y extremadamente baja (Mandeville y col., 2000, Harada y col., 2001; Rojas y col., 2001; Tofani y col., 2002; Loscher, 2002; Negishi y col., 2002; Verheyen y col., 2003).

Teniendo como base los posibles efectos biológicos de sistemas acuosos tratados magnéticamente, en específico en la respuesta inmune y su inocuidad potencial, por primera vez en nuestro país y a nivel internacional en este trabajo se investiga sobre los efectos biológicos e inmunopotenciadores (adyuvante inmunológico) de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente (CM-95 TM) con un campo magnético estático.

### **Problema**

No se ha reportado en la literatura científica la evaluación de ninguna solución tratada magnéticamente que potencie eficazmente la respuesta inmune con el mínimo efecto adverso en el organismo.

### **Hipótesis**

Si la Solución CM-95 tratada magnéticamente induce efectos biológicos *in vivo e in vitro* y potencia la respuesta inmune humoral y celular, entonces se puede proponer a esta como un inmunopotenciador.

Para la aceptación o rechazo de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos.

### **Objetivo General**

Evaluar los efectos biológicos y la potenciación de la respuesta inmune de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente en biomodelos *in vivo e in vitro*.

### **Objetivos específicos**

- Determinar efectos biológicos que induce la Solución CM-95 tratada magnéticamente en ratas *Sprague Dawley* y ratones Balb/c.

- Evaluar la acción de la Solución CM-95 tratada magnéticamente sobre la producción de anticuerpos en la respuesta inmune humoral.
- Evaluar los efectos de la Solución CM-95 tratada magnéticamente sobre elementos de la inmunidad celular.
- Determinar preliminarmente la toxicidad e inmunotoxicidad de la Solución CM-95 tratada magnéticamente a dosis repetida en ratas *Sprague Dawley*.

Para cumplir estos objetivos se trazaron las siguientes tareas.

- Evaluación del transporte de glucosa en intestino de ratas SPD y análisis del comportamiento de parámetros bioquímicos y hematológicos generales en ratones Balb/c inoculados con CM-95 TM.
- Estudio de la respuesta de anticuerpos antibacterianos inducida por CM-95 TM a diferentes inducciones magnéticas en ratones Balb/c, inmunizados por las vías intraperitoneal (I.P.), subcutánea (S.C.), e intravenosa (I.V.), y en conejos NZB, por vía I.V, así como la producción del isotipo murino IgG y las subclases IgG1 e IgG2a.
- Evaluación del uso de CM-95 TM como adyuvante inmunológico en la obtención de seis sueros específicos para bacterias del género *Bacillus* en conejos NZB inmunizados por vía I.V.
- Evaluación de la respuesta inmune celular, mediante los efectos de CM-95 TM sobre la proliferación de células mononucleares periféricas (CMNPs) humanas y activación de macrófagos peritoneales en ratones Balb/c (conteo, activación de fosfatasa ácida lisosomal, FAL, y fagocitosis), así como hipersensibilidad retardada (HRT), producción de INF $\gamma$  e IL-5.
- Análisis preliminar inmunotoxicológico de la Solución CM-95 TM, en tres niveles de inducción magnética a dosis repetida, durante 7 y 28 días, en ratas SPD, a través de la evaluación de signos clínicos, peso de los animales, peso relativo de timo y bazo, celularidad de médula ósea, conteo total y diferencial de leucocitos, inmunocomplejos circulantes, concentración de proteínas y glucosa, así como el análisis anatomopatológico.

**Novedad Científica**

Por primera vez en este trabajo a nivel nacional e internacional se evalúa la acción inmunopotenciadora de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente.

**Aportes del Autor**

- Se hace una contribución científica en el campo de la inmunología ya que por primera vez se propone la Solución CM-95 TM como un inmunopotenciador de nueva creación, reproducible, de bajo costo, invasividad mínima, con propiedades y mecanismo de acción diferentes a los inmunoestimulantes convencionales.
- La Solución CM-95 TM se propone por primera vez como adyuvante inmunológico para la obtención de sueros antibacterianos (kit-diagnóstico anti- Bacillus), aspecto novedoso dentro la Inmunotecnología, además de que esta podría constituir una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades, tales como el SIDA y el cáncer, entre otras.

# CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Inmunomoduladores

Las sustancias inmunomoduladoras constituyen una familia muy heterogénea si se toma en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica. Estas sustancias tienen la capacidad de modular la respuesta inmune por un proceso de estimulación o supresión de la misma (Takx, 1992). Dentro de ellas ocupan un lugar muy importante los inmunopotenciadores, a los que se les atribuyen funciones importantes en el tratamiento de las inmunodeficiencias, de algunos tipos de infecciones virales y bacterianas y en especial en el tratamiento del cáncer, cuando las radiaciones y los medicamentos anti-cancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune. Estos agentes son generalmente combinados con la quimioterapia y radioterapia o después de ellas, denominándosele al tratamiento inmunoquimioterapia (Morris y col., 2000).

Entre los usos mencionados de los inmunopotenciadores está el de potenciar la inmunogenicidad de las vacunas y dentro de ellas, las obtenidas por nuevas tecnologías como la del ADN recombinante o de antígenos sintéticos, llamadas *Vacunas de Nueva Generación* (Gupta y col., 1992). Otra aplicación es en la inmunización experimental con vista a la obtención de antisueros policlonales y AcM, a estos inmunopotenciadores en particular se les denomina adyuvantes inmunológicos (Azuma, 1992). Es por ello que dentro de la Inmunología Experimental se incluyen las investigaciones dirigidas hacia la búsqueda y evaluación de nuevas sustancias con actividad inmunomoduladora, con mayor fuerza hacia la inmunopotenciación.

Los inmunomoduladores actúan a diferentes niveles del sistema inmune, existiendo la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o sub-poblaciones de células para la respuesta inmune, como linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células asesinas NK, citotóxicas CTL, o la

producción de mediadores solubles como las citocinas (Stites, 1985; Stewart, 1989; Morris y col., 2000).

Los inmunomoduladores pueden actuar de forma específica o inespecífica:

### 1.1.1 *Inmunomoduladores inespecíficos*

Son agentes que logran una estimulación o supresión de la respuesta inmune sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado; se diferencian tres tipos según su acción (Takx, 1992):

- Tipo I: Los que actúan sobre el Sistema Inmune normal.
- Tipo II: Los que actúan sobre el Sistema Inmune inmunodeprimido.
- Tipo III: Los que actúan sobre el Sistema Inmune normal e inmunodeprimido.

### 1.1.2 *Inmunomoduladores específicos*

Logran su acción sobre las células del sistema inmune por la presencia de un inmunógeno dado, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es activa cuando hay estimulación y su resultado signifique una inmunorreacción hacia uno o varios antígenos, como es el caso de los adyuvantes inmunológicos o de las vacunas terapéuticas (Takx, 1992; Gupta, 1996; Klein y col., 1997; Abbas y col., 2000).

*1.1.3 Tipos de Inmunomoduladores. Acción terapéutica*

Inmunomodulador	Modo de acción	Efecto de Modulación	Aplicación
Bacilo Calmette Guering (BCG)	Inespecífico Específico	Activación de macrófagos, células T, producción IL-2.	Vacuna terapéutica cáncer de vejiga, ovario, colon, melanomas (Sensi y col., 1997; Vermoken y col., 1999; Berd y col., 1999,2000; Michael y col., 2001).
Levamisol	Inespecífica	Restauración respuesta inmune humoral y celular	Inmunodeficiencias por helmintos y protozoos (Vanselón, 1989).
Muramyl Dipéptido (MDP)	Inespecífica Específica	Estimulación respuesta Inmune humoral y celular, acción antitumoral.	Tratamientos del cáncer, infecciones bacterianas (Gupta, 1996).
Glucanos (hongos y algas)	Inespecífica Específica	Estimulación respuesta inmune humoral y celular, sistema complemento y células del SER.	Terapia tumoral para oncogénesis virales y metástasis (Stites, 1985, Dantos y col., 1999; Mary, 2000).
Hormonas Tímicas, Timosina y Timopoyetina	Inespecífica	Diferenciación y maduración de linfocitos T y estimulación de la inmunidad celular	Terapia de inmunodeficiencias de células T (Stites; 1985; Abbas y col., 2000)c
Proteínas del complemento (globulinas)	Inespecífica Específica	Activación respuesta inmune humoral	Terapia de hipogamaglobulinemias y anemias (Stites, 1985)
Citoquinas IL-1, INF $\gamma$ , IL-2, IL-5, FTN $\alpha$ , IL-18, Factor de Transferencia, GM-CSF.	Inespecífica Específica	Regulación y activación de la respuesta inmune humoral y celular.	Terapia de inmunodeficiencias, cáncer, hepatitis, recuperación hematopoyética (Salgaller, 1998; Shung y col, 2000; Silla y col., 2000).
Lectinas, Conavalina A y PHA	Inespecífica	Acción mitogénica de linfocitos y su activación.	Estudios de la activación de linfocitos (Abbas y col., 2000).
Lipopolisacárido Bacteriano (LPS)	Inespecífica Específica	Activadores de linfocitos, macrófagos y TNF $\alpha$ .	Terapia experimental de inmunodeficiencias (Abbas y col., 2000).
Toxina (Mistetloe) de origen vegetal.	Inespecífica	Activador de células NK, macrófagos, PMN, FNT, INF $\gamma$ , IL-1 e 1L-6.	Terapia del cáncer (Elssasser y col., 1998; Mengs y col., 1999; Hajto y col., 1999; Szatmary, 2000; Hyunock y col., 2000).

### *1.1. 4 Adyuvantes inmunológicos*

El término adyuvante se deriva del vocablo latino *adyuvare*, que significa ayudar. La calidad inmunológica de biológicos como antisueros policlonales, AcM y vacunas, o el logro de la inmunoestimulación efectiva, dependen del uso de adyuvantes inmunológicos o inmunopotenciadores. Por definición, estas sustancias son preparados biológicos ó químicos que, incorporados junto al antígeno en un organismo dado (vertebrados) hacen más efectiva la respuesta inmune, haciendo esta más rápida, fuerte y duradera, lo que significa un ahorro de tiempo y antígeno (Klein y col., 1997; Roitt y col., 1998; Abbas y col., 2000).

Estas sustancias han sido utilizadas por más de setenta años para aumentar la respuesta inmune específica (Gupta y Siber, 1995). Los primeros estudios de adyuvancia se remontan a la primera mitad del siglo XIX. Pasteur (1851) intentó combatir enfermedades infecciosas y producidas por tumores mediante la aplicación de bacterias vivas; en los decenios siguientes se aplicaron lisados de bacterias para la adyuvancia y más tarde proteínas lipoproteínas (Tum, 1988).

Le Maignic y Pinoy (1916), encontraron que una suspensión de *Salmonella typhimurium* atenuada en aceite mineral aumentaba la respuesta inmune. Ramón (1925) mostró el aumento de la respuesta antitoxina contra toxoides tetánicos y diftéricos, inyectados conjuntamente con agar, lecitina, almidón oleoso, saponina u otros, aportando los primeros trabajos sobre inmunoestimulación específica (Gupta y Siber, 1995).

Glenny y col. (1926), informan por primera vez sobre el hidróxido de aluminio. A partir de aquí se desarrollaron otros compuestos, como sulfatos y fosfatos, usados en vacunas humanas y otras sales minerales como fosfato de calcio, sulfato de zinc, nitratos, hidróxido de hierro coloidal y cloruro de calcio (Gupta y col., 1995; Limbland, 1995; Aucouturier y col., 2001).

Freund (1937), demostró los efectos del aceite mineral (parafina) mezclado con micobacterias muertas o atenuadas, pertenecientes al bacilo bovino de la tuberculosis (BCG), a esto se le llamó Adyuvante de Freund Completo (AFC) y a la emulsión de

agua con aceite mineral Adyuvante de Freund Incompleto (AFI) (López y col., 1981; Gupta y Siber, 1995; Stewart, 1995; Aucouturier y col., 2001). A partir del descubrimiento del efecto de los agentes oleosos, se evaluaron varias clases de emulsiones como escualeno / escualeno en agua con emulsificantes de ésteres de ácidos grasos y alcoholes polihídricos como el Tween (Hunter y col., 1991), MDP (Takidat y col., 1995), Trealosa Dimicolato (TDM), y también el MF-59 formado por escualeno, Tween-80 y Span 85, lo que ha permitido su uso con gran seguridad y eficacia para vacunas contra los virus del herpes simple (VHS), contra la inmunodeficiencia humana (HIV) y para el virus de la influenza humana (Ott y col., 1995, 2000; Podda, 2001).

El efecto adyuvante de los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram (-) se reportó por Johnson y col. (1956). El lípido A, componente del LPS, también tiene acción inmunoestimulante (Gupta, 1996), pero su derivado más efectivo ha sido el Monofosforil Lípido A (MPL), ya que es menos tóxico y junto a otros compuestos logra mayor adyuvancia (Baldrige y col., 1999).

Las saponinas aisladas de *Quillaja saponina*, cuyo componente activo es el Quil A, ha permitido la separación de otros compuestos como el QS -21 con una alta potencia y menor toxicidad, y todos con acción inmunoestimulante (Evans y col., 2001) y el ISCOMs, compuesto por Quil A, colesterol y antígeno anfipático (Morein y col., 1999; Guy y col., 2001; Sjolander y col., 2001).

Desde hace veinte años, los liposomas también han sido reconocidos como adyuvantes (Alving, 1993; Gupta y col., 1992; Pietrobon, 1995; Aguado y col., 1999). La tecnología de liposomas se ha ido modernizando hacia la obtención de vesículas compuestas de fosfolípidos, o la obtención de otros liposomas no fosfolipídicos (Novasomas) compuestos de dioxi-etileno-cetil-eter, colesterol y ácido oleico (Gupta, 1996).se obtienen además los *Virosomas* o liposomas fusogénicos al insertar virus fusionados con proteínas en la bicapa lipídica del liposoma, teniendo mayores propiedades *carrier-adyuvante* que cuando se utiliza para liberar antígenos encapsulados (Guy y col., 2001).

Es eficiente utilizar liposomas para encapsular compuestos del aluminio y estos unidos al MPL con inulina, o del LPS para lograr la pérdida de toxicidad (Cooper, 1994), y se ha demostrado su acción efectiva en la respuesta inmune celular y humoral frente a parásitos como la malaria (Richard y col., 1998) y con QS-21 (Gupta y col., 1995; Aucouturier y col., 2001). Guy y col. (2001) reportaron el uso de liposomas elaborados con lípidos catiónicos para algunas vacunas del virus de la influenza.

Otra forma de adyugar las vacunas es la preparación de proteosomas que son vesículas obtenidas de proteínas hidrofóbicas de membrana externa de bacterias como meningococos (Graeme y Woodman, 1990; Sierra y col., 1991). Se han evaluado proteoliposomas de la membrana externa de meningococos para obtener la vacuna antimeningocócica de tipo B, lográndose buena respuesta de tipo humoral y celular (Sierra y col., 1991; Aguilar y col., 2000).

Las microesferas de polímeros biodegradables son hechas a partir de una variedad de polímeros tales como poliácido láctico/glicólico (PGLA), polianhidrida y polyfosfazene, etc. (Stewart, 1989; Morris y col., 2000; O'Hagan y col., 2000). La inclusión del toxoide tetánico (TT) en microesferas biodegradables dio mejores resultados que con hidróxido de aluminio (Yin y col., 1995; Gupta, 1996), mientras que O'Hagan y col. (1997), desarrollaron la emulsión MF-29, la que encapsulada en microesferas o en micropartículas en combinación con la proteína recombinante del HIV-1, produce respuestas de tipo Th2 (O'Hagan y col., 2000).

Al inocular animales de laboratorios con glucanos, se han obtenido respuestas para contrarrestar infecciones frente a *Pseudomonas pseudomalei*, *Leishmania major*, *Mycobacterium leprae*, *Cándida albicans*, el virus del herpes simple (HSV) y la hepatitis murina o con el uso de antígenos enlazados a polisacáridos como al carragenano y al sulfato de dextrano. (Morris y col., 2000).

#### *1.1.4.1 Clasificación de los adyuvantes inmunológicos (Vanselón 1989)*

*Sustancias Biológicas:* Microorganismos y sus productos, como las bacterias de la tuberculosis incorporadas al AFC, o mezcla de toxinas bacterianas usualmente derivadas de estreptococos, serratias, saponinas, vitamina A, vitamina E, Lanolina.

*Productos químicamente definidos de hongos, bacterias y algas:* Muramil Dipéptido (MDP), Trealosa Dimicolato (TDM), Proteína P40 asociada al peptidoglicano de la pared bacteriana, Lípido A, LPS proveniente de bacterias Gram (-), glucanos de hongos y algas.

*Productos biológicos del sistema inmune:* Hormonas del timo (Timosina), citocinas (IL-2, INF $\gamma$ ), etc.

*Productos sintéticos análogos a los productos biológicos.*

*Preparaciones químicas:* Compuestos del aluminio Al (OH)<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, (CaPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, (K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), sulfato de dextrano y liposomas.

#### *1.1.4.2 Mecanismos de acción de los adyuvantes inmunológicos*

La heterogeneidad de los compuestos químicos y biológicos que forman parte de los adyuvantes inmunológicos pueden explicar los mecanismos de acción y efectos diferenciados que poseen estas sustancias (Tum, 1988; Vanselón, 1989, Gupta, 1996). Se incluyen los que causan depósito en el sitio de inyección, al insolubilizarse el antígeno lo van liberando lentamente, producen reclutamiento al transportar antígenos hasta las células inmunocompetentes (liposomas, proteoliposomas, surfactantes, polímeros no iónicos) y los de acción inmunoestimulantes como AFC, MDP, LPS, Lípido A, MPL, citocinas y proteosomas.

Formulaciones de adyuvantes como AFC, MDP, MPL,  $\delta$ -Inulina, liposomas, QS-21, estimulan la respuesta Th1 en ratones, mientras que los adyuvantes del aluminio, toxina colérica y otros minerales se conoce que estimulan la respuesta Th2 (Gupta y Siber, 1995, Gupta y col., 1996). En el caso de antígenos inactivados de *Candida albicans* estimulan ambas respuestas (Th1/Th2) (Casalinuovo y col., 2000).

En este proceso de modulación deben participar otras células que tienen la función de realizar la presentación del antígeno a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, con la participación de antígenos del Sistema de Histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II. La respuesta MHC clase I generalmente aparece en infecciones producidas por patógenos

intracelulares, como virus o parásitos que conducen a la producción de linfocitos citotóxicos (CTL) (Paúl, 1993; Abbas y col., 2000), por tanto la misma se produce en presencia de proteínas endógenas. Sin embargo, se ha planteado que con el uso de adyuvantes la respuesta inmune puede ser modulada a MHC clase I o clase II; es el caso de los adyuvantes del complejo inmunoestimulante ISCOMs formado por la unión no covalente del adyuvante Quil-A, colesterol y antígenos anfipáticos y QS-21. que son capaces de producir respuesta CTL ante la presencia de proteínas exógenas, péptidos y virus inactivados, cuando correspondía obtener una respuesta MHC clase II (Waj y col., 1992; Cooper, 1994). Otro efecto de los adyuvantes es el de reclutar en el sitio de inoculación células mononucleares periféricas de gran importancia en la fase inductora y efectora de la respuesta inmune (Abbas y col., 2000).

Con el uso de vacunas conjugadas, polisacáridos unidos a proteínas se logra que la respuesta inmune pueda ser T-dependiente. El cambio de la inmunogenicidad puede lograrse con la polimerización de antígenos protéicos y la cationización de proteínas (Casalnuovo y col., 2000).

#### *1.1.4.3 Seguridad de los adyuvantes inmunológicos*

Como criterio de seguridad los adyuvantes inmunológicos deben ser químicamente definidos, capaces de inducir respuesta inmune protectora con antígenos débiles; producir efectos con dosis bajas (pocas inyecciones), efectivos en niños pequeños y recién nacidos, capaces de producir respuesta inmune persistente y de alta afinidad con anticuerpos de la clase IgG; atóxicos (inocuos), lo que los hace seguros; biodegradables y no inmunogénicos por sí mismos (Edelman, 1992; Gupta y col., 1995 a; Aucouturier y col., 2001).

#### *1.1.5 Evaluación preclínica y toxicológica de los inmunopotenciadores*

Las sustancias propuestas como inmunomoduladores y dentro de ellas los inmunopotenciadores, pueden facilitar el desarrollo de una respuesta eficaz, pero cuando introducimos en el organismo una sustancia capaz de interactuar con la compleja red del

sistema inmune, formada por células de diferentes tipos y orígenes, mediadores solubles, receptores de membrana, coestimuladores, que actúan de forma armónica y regulada (Abbas y col., 2000), hay que estudiar la posibilidad de inhibición de alguna rama o vía importante del sistema, la generación de reacciones autoinmunes o el desarrollo de la hipersensibilidad inmediata, entre otras respuestas (Batista y col., 1998).

Debido a que los inmunopotenciadores conocidos y los que están en desarrollo son de diversos orígenes, deben ser sometidos a una evaluación toxicológica, de forma individual y de ser necesario con la molécula antigénica si serán administrados conjuntamente con ésta como producto terminado (Van, 1989; Koeter, 1995; Batista, 1998).

Para desarrollar estudios de toxicidad en preparados vacunales o inmunopotenciadores, los roedores son los animales que por excelencia se usan, con inoculaciones a dosis repetida, teniendo en cuenta que su dosis de aplicación generalmente es más de una vez. Al utilizarse en su mayoría como inyectables, habrá que realizarle los estudios de pirogenicidad en los casos que no se posea información y acuerdos con el candidato propuesto y las exigencias de las autoridades regulatorias, y considerar el test de tolerancia local, al producir algunas reacciones en el sitio de la inyección (granulomas) (Vohr, 1995; Comité Proprietary Medicinal Products (CPMP), 1997). Aún no existe un consenso entre la principales agencias regulatorias internacionales para la evaluación toxicológica de sustancias que tengan efectos en el sistema inmune, se puede observar un grado de redundancia en las técnicas propuestas. La Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) destaca los estudios anatomopatológicos como la base para los ensayos de evaluación del sistema inmune. Otras Agencias, como el Programa Nacional de Toxicología, la Agencia de Protección Ambiental, la Agencia Federal de Estados Unidos para la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y el Instituto de Salud Pública y Protección Ambiental de Holanda, le han sumado a los estudios de anatomía patológica los modelos de resistencia a infecciones y la acción sobre tumores (Lebeque, 1997; Hechevarria, 1999).

### 1.1.6 Tendencias actuales en la inmunomodulación

La tendencia actual está dirigida hacia la investigación de inmunomoduladores naturales presentes en la sangre o en el tejido linfoide, así como de sustancias de origen natural que hagan estas funciones; se logran respuestas específicas e inespecíficas, pero sin reacciones adversas. La década de los 90s ha reafirmado éstos criterios, intensificándose la obtención de diversos productos del sistema inmune para la inmunoterapia, con la ayuda de nuevas tecnologías como el ADN recombinante, para lo que se han clonado genes que codifican la síntesis de citoquinas; por otro lado, se les ha transferido genes del TNF $\alpha$  de macrófagos a pacientes con melanoma (Gabriele y col., 1995). Se ha trabajado en la modificación de las membranas celulares de tejido tumoral humano, transfectando moléculas coestimuladoras tales como B7-1 y B7-2 en las células tumorales, lo que ha conducido a la proliferación de células-T y a la protección inmunológica contra el cáncer (Mc Hugh y col., 1999; Neil y col., 2001).

Para vacunas terapéuticas se han utilizado Anticuerpos Monoclonales (AcM) anti-idiotipos, los cuales compiten con los antígenos tumorales. Se han hecho investigaciones con AcM quiméricos (ratón / humano) para aumentar la eficacia terapéutica en el tratamiento de sepsis, para controlar procesos inflamatorios, y en el control del rechazo de órganos trasplantados (Gavilondo, 1995). Zubari y col. (2004) reportaron el uso inmunoterapéutico de la proteína CX4OL- FC o del AcM anti CTLA-4 (receptor células T) para la leishmaniasis.

Se ha reportado el uso de inmunomoduladores conjugados. Recientes estudios encontraron que varias combinaciones para el tratamiento clínico con TNF $\alpha$ , GM-GSF, INF $\gamma$ , IL-2 y Factor de Transferencia aumentan la citotoxicidad de leucocitos y también la apoptosis de células tumorales (Shung y col., 2000). Una tendencia moderna es la obtención de vacunas conjugadas a partir de polisacáridos capsulares de neumococos y meningococos (Siber, 1994). Se han desarrollado otras experiencias encapsulando vacunas compuestas de un polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* (Hib) y (toxoides tetánico (TT) en microesferas de PGLA. Smith Kline usa una formulación de vacuna conjugada fusionando la proteína D de *Haemophilus influenzae* con la proteína HPV 16 (asociada al virus del papiloma humano VPH) y adyuvada en MPL y QS-21

en diferentes vehículos: con liposomas, emulsiones de aceite y agua o sales de aluminio para la terapia del cáncer cervical asociado al VPH (Gerard y col., 2001). Se han utilizado otras combinaciones de adyuvantes como QS-21 y MPL para vacunas con péptidos tumoroespecíficos (Sillas y col., 1999), con proteínas recombinantes del HIV (Moore y col., 1999; Bernan, 2001) o el acoplamiento de antígenos a la toxina colérica (TC) para vacunas de células dendríticas que propician una respuesta inmune citotóxica CTL (Erlicsson y col., 2004).

En vacunas mucosales se ha logrado el uso de la toxina colérica (TC) y la endotoxina de *Escherichia coli* (LT), a partir de bacterias mutantes con reducida toxicidad (Pizza y col., 2000). Las vacunas de ADN, constituyen una de las tendencias en este campo y son conducidas con la inyección de plásmidos de ADN que codifican antígenos para inducir respuesta inmune específica a ellos; constituyen la base de nuevas vacunas (Pierre y col., 2001). Otra modalidad es el atrapamiento de los plásmidos en microagregados (Orson y col., 2000), así como la electroporación in vivo (Widera y col., 2000).

Se ha encontrado que el ADN por sí mismo tiene actividad adyuvante a través de la región con motivos CPG (Soto y col., 2000), propiedad que ha sido utilizada para modular el ADN (Tascon y col., 2000) y adyugar vacunas proteicas (Cho y col., 2000; Tighe y col., 2000). Otra alternativa para modular la respuesta inmune en vacunas de ADN, es la construcción de adyuvantes genéticos donde se insertan genes de citocinas en los plásmidos de ADN (Cohen y col., 1998; Pierre y col., 2001). Recientes investigaciones han desarrollado el uso de citocinas, quimoquinas y moléculas coestimuladoras como adyuvantes genéticos para vacunas ADN; sus genes se expresan en plásmidos de ADN, para aquellas citocinas que inducen respuestas Th1 o Th2 (Pierre y col., 2001).

A pesar de los avances en este campo, aún no se ha reportado ninguna investigación relacionada con el uso de sustancias salinas tratadas magnéticamente para lograr la inmunopotenciación.

## **1.2 Biomodelos experimentales**

Los animales de laboratorio están dentro de los instrumentos más valiosos que se utilizan en la investigación biomédica. Existen ventajas para la experimentación en

modelos animales, ya que da la posibilidad de conocer la historia natural de determinada enfermedad, en especial, la posibilidad de poder evaluar medios terapéuticos (medicamentos, fisioterapias, cirugías), cuya aplicación en humanos se considera peligrosa o no ética. Por otro lado, se ha demostrado la posibilidad de estudiar enfermedades inmunológicas o cancerosas con el uso de animales isogénicos o líneas consanguíneas (Infante, 2000).

A pesar de las ventajas en el uso de los biomodelos experimentales, Melius (1997) se refirió a la ética de éste, y planteó tres aspectos o regla de las tres **R** con vista a ser más racional y ético el uso de los biomodelos experimentales, estos tres aspectos son: 1) el **Reemplazo**, sustituyendo el animal por modelos *in vitro*; 2) **Reducción**, si se evita la experimentación repetitiva y ajustando el número de animales al mínimo necesario que permita obtener datos estadísticamente confiables; y, 3) **Refinamiento**, evitando a toda costa el sufrimiento de los animales de laboratorio, y se refiere entre otros aspectos al sacrificio humanitario (eutanasia) de estas especies en el contexto de las investigaciones científicas y las pruebas de control.

### *1.2.1 Tendencias en el uso de biomodelos experimentales*

Científicos como Mora y Lomeli (1996) valoraron en un análisis retrospectivo de cincuenta años (1940-1990), que el 22 % de los artículos publicados en ese período, reportaban el uso de animales de laboratorio, en particular en el área de Inmunología cada tres artículos del total en la temática, involucraban el uso de especies animales.

Para la evaluación de sustancias con actividad inmunomoduladora donde se incluyen los inmunopotenciadores, son muy utilizados los roedores como especie animal para su evaluación, específicamente las líneas de ratones isogénicas Balb/c y C57Bl/6, lo que se ha demostrado en numerosos trabajos desarrollados en este campo.

Durante los últimos años se ha mantenido como tendencia el uso de la línea de ratones Balb/c para estudios de inmunomodulación. Thomas y col. (1998), conocieron los efectos de la IL-10 y el biopreparado del factor de crecimiento tumoral TGF $\beta$  sobre la

inducción de la respuesta inmune, a través de estudios de inmunogenicidad, producción de citocinas, inducción de hipersensibilidad retardada (HRT) y actividad fagocítica. Otros trabajos han referido el estudio de la respuesta a IgE y citocinas en ratones Balb/c y C57B1/6 infectados con *Plasmodium chabaudi* (Helmby y col., 2000).

En el campo de las vacunas y la de los AcM murinos, la línea de ratones Balb/c también se ha utilizado en gran escala. Guy y col. (2001) hicieron la caracterización de eficacia preclínica de un adyuvante lipídico catiónico para la vacuna de la influenza en ratones Balb/c hembras; mientras que Gerard y col. (2001) reportaron los ensayos de inmunogenicidad de una vacuna antitumoral en ratones C57B1/6.

Los estudios toxicológicos pre-clínicos son más específicos y demandan de modelos escogidos para cada caso, ya que la extrapolación de la respuesta humana no es posible y sin embargo algunos biomodelos tienen un mayor valor es predictivo en todos ellos. Para los estudios de inocuidad de la vacuna VAMENGOC-BC se usaron ratones, curieles, conejos, ratas Sprague-Dawley (Infante y col., 1996; 1997). Para la evaluación toxicológica de sustancias inmunopotenciadoras se han recomendado ratas Sprague-Dawley y ratones (Batista y col., 1998; Selena y col., 1998).

### **1.3 Magnetismo. Características del campo magnético**

El Magnetismo como ciencia surgió de la observación de que ciertas piedras (*magnetita*) atraían pedazos de hierro; se considera que los griegos desde el año 600 antes de Cristo ya estaban familiarizados con las propiedades que poseía esta piedra imán, mientras que los chinos conocieron del magnetismo desde el año 2600 a.c. (Bardasano, 1999, 2000).

El *Campo Magnético* es el tipo especial de materia por medio del cual tienen lugar las interacciones entre las cargas eléctricas en movimiento situadas dentro del campo así como en otros cuerpos que poseen momento magnético; es una de las manifestaciones del campo eléctrico. De aquí que el magnetismo sea un fenómeno físico muy ligado a la electricidad, cuya complejidad hace que no sea fácil comprender teóricamente sus principios y fundamentos (Remisov, 1987; Bardasano, 2000).

El espectro electromagnético comprende, en función de la longitud de onda o de su inversa la frecuencia, las denominadas radiaciones ionizantes (frecuencias comprendidas entre  $10^{17}$  y  $10^{22}$  Hz) y las radiaciones no ionizantes (frecuencias de 1 a  $10^{17}$  Hz). Esta radiación no ionizante, por su parte, se subdivide en radiaciones ópticas (frecuencias de  $10^{12}$  a  $10^{17}$  Hz) y los llamados campos electromagnéticos (frecuencias de 1 a  $10^{12}$  Hz). A su vez, estos se dividen en microondas, radiofrecuencias e infraradiofrecuencias. Para el caso particular de frecuencia 0 Hz, el campo magnético se denomina estático.

La parte más controvertida del espectro electromagnético es la de los campos magnéticos estáticos y electromagnéticos de frecuencias extremadamente bajas (de 1 hasta 300 Hz), este último dentro del rango de las infraradiofrecuencias. Esto se explica por los resultados contradictorios reportados y porque los efectos biológicos inducidos por estos campos sugieren que los mismos pueden tener una influencia positiva o perjudicial a la salud. La controversia de este rango también estriba en que el mecanismo de acción es pobremente entendido (Pallares, 1998; Bardasano, 2000).

La magnitud física que caracteriza el Campo Magnético es la inducción magnética  $B_0$ , que en el Sistema Internacional de Unidades (SI), se expresa en Tesla, ( T ) (Remisov, 1987; Bardasano, 2000).

El campo magnético puede generarse a través de un electroimán o de un imán permanente. En el primer caso, la inducción magnética depende de la relación ampere-vuelta y de la geometría del electroimán; sin embargo, en el segundo caso, esta depende de la distancia entre los polos del sistema magnético, la intensidad, polaridad y distribución de los polos.

Bardasano (2000) reportó que el campo magnético produce una fuerza magnética sobre la materia, la cual depende de las características de la muestra (volumen y susceptibilidad magnética) y del producto de la inducción magnética por el gradiente de campo magnético; de estos parámetros físicos, el de mayor peso es el gradiente de campo magnético.

La inmensa mayoría de los tejidos biológicos son diamagnéticos; por lo tanto, la influencia directa del campo magnético de la tierra sobre ellos es muy débil. No ocurre

así con los materiales paramagnéticos y ferromagnéticos donde los campos pueden sumarse vectorialmente.

El campo magnético induce a que el medio esté excitado durante un tiempo determinado, denominado *tiempo de relajación*. Si en el sistema no se han producido cambios irreversible durante este tiempo, el medio recuerda los cambios producidos por el campo magnético externo, fenómeno que se conoce como *memoria magnética*, el cual depende de parámetros físicos del campo magnético (inducción magnética, gradiente de campo magnético, tiempo de exposición) y de las propiedades del medio (Bardasano, 2000).

Los imanes permanentes así como los electroimanes pueden ser usados en el tratamiento magnético de soluciones acuosas (Font, 1994). Klassem (1982) reportó que la acción del campo magnético sobre el agua que fluye a una velocidad dada, dura pequeñas fracciones de segundos; no obstante, se acuerda de este durante horas. Se han desarrollado numerosos trabajos encaminados a demostrar la existencia del tiempo de relajación o memoria magnética en diferentes sistemas, destacándose los referidos por Klassem (1982); Higashitani y col. (1996); Rodríguez y col. (1998); Viltre y col. (1999), Miruslav (1999) y la mayoría de los estudios en sistemas acuosos (agua o sales).

Los criterios de las normas y recomendaciones internacionales para establecer los límites de exposición a los campos magnéticos y electromagnéticos dependen de la frecuencia considerada y las normas establecen límites de exposición basados en los efectos que producen (Fernández, 1998).

En la Conferencia Americana de Gobierno de Higienistas Industriales (ACGIH) celebrada en 1994 en Cincinnati, se estableció que el campo magnético estático estándar con exposición diaria no podría exceder de 0,06 . La comisión sobre protección de radiaciones no ionizante (ICNIRP) (1998) considera como valor extremo hasta 0,2 ; sin embargo, en estudios realizados con campos magnéticos estáticos de hasta 2 , como los usados en los equipos de Resonancia Magnética Nuclear de Imágenes, no se han encontrado efectos adversos de salud. (Rapacholi y col., 1999; 2003).

La propuesta de la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (junio, 1998) relativa a la exposición de la población a campos magnéticos de frecuencias extremadamente bajas y de campos estáticos, plantea que en la actualidad no existen pruebas convincentes de los efectos de los mismos y en especial como carcinógenos, son aún insuficientes los datos epidemiológicos para permitir recomendaciones de límites de exposición a los mismos.

No obstante, investigaciones recientes con campos magnéticos estáticos y de frecuencias extremadamente bajas indican la no- existencia de efectos genotóxicos, ya que no producen aberraciones cromosómicas entre cromátidas hermanas (Moulder, 1997). Esto se confirma en experiencias sobre genotoxicidad relacionadas con la inducción de roturas en ADN de cadena sencilla, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas, formación de micro núcleos, alteraciones de los sistemas de reparación, efecto sobre la capacidad genotóxica de otros agentes, donde se indica que estos campos magnéticos no tienen la capacidad de producir daño a nivel del ADN, o lo que es lo mismo, no pueden considerarse genotóxicos (Sánchez,1996; Fernández, 1998; Gray y col.,2000; Rojas y col., 2001; Tofani y col., 2002; Verheyen y col., 2003).

### *1.3.1 Efectos del campo magnético*

#### *Efectos biológicos*

Los cambios observados en las propiedades físicas y físico-químicas de los sistemas tratados magnéticamente, deben tener una influencia directa en los organismos vivos, diferentes científicos como Klassem (1982); Polk y Pastow (1986), Massaki (1997), Bardasano (2000), Zhadin (2001), Larry y col. (2003), entre otros, han tratado de dar explicación a los efectos del campo magnético sobre las células de los organismos vivos. En 1989 aparecieron reportes que plantean la existencia de tres efectos básicos que pueden explicar el comportamiento de los organismos vivos al recibir tratamiento magnético, los cuales han sido confirmados en estudios posteriores. Entre estos efectos se incluyen: efecto de magnetización, efecto metabólico y efecto piezoeléctrico (Colectivo de autores, Tribuna Médica 1989).

*Efecto de magnetización*

Se le denomina así al efecto biológico primario, que provoca la reorientación de moléculas y átomos dipolares bajo un campo magnético. Se produce sobre elementos con momentos magnéticos no nulos; por ejemplo, cuando una solución acuosa atraviesa un campo magnético se produce en ella una reorientación de cargas, si posee moléculas o átomos dipolares, inducida por la posición de los imanes que dan una dirección al campo, Norte - Sur o Sur - Norte, orientándose así el campo positivo hacia al negativo o viceversa.

Fernández (1998) refiere que si 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, la exposición de los mismos a un campo magnético estático o a soluciones tratadas magnéticamente, debería producir cambios sobre dichos procesos, para lo cual debe existir un mecanismo físicamente plausible que produzca una señal (intensidad de campo) sobre las moléculas cargadas, distinguible del nivel de ruido producido como consecuencia de la actividad biológica del organismo.

Rapacholi y col. (1999), reportaron que el campo magnético estático es menos imperturbable para los tejidos biológicos, y ejercen su acción sobre estructuras polarizadas como los iones en movimiento (en solución), por la fuerza del campo y es la razón para inducir un campo eléctrico y corrientes.

El efecto de magnetización conduciría a las siguientes variaciones en la célula (Colectivo de autores, Tribuna Médica 1989):

- Modificación de la permeabilidad de membrana, con aumento en el flujo de iones a través de la misma por estabilización de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , debido a que los campos magnéticos inducen un aumento de actividad de las ATPasas y de las oxidasas, consiguiendo un mejor funcionamiento de la dicha bomba.
- Estimulación de la reproducción celular, por incremento de la síntesis de ADN durante la mitad de la fase S de reproducción celular
- Aumento del número de ribosomas, dilatación del retículo endoplasmático, aumento en número y densidad de mitocondrias.

- Favorece los procesos de enlace, donde participan receptores y ligandos como es el caso de las enzimas – sustratos; hormona – receptor; anticuerpo- antígeno y otros que pueden ser de acoplamiento inespecífico.

Estos planteamientos no contradicen otras experiencias desarrolladas para dilucidar los efectos de la magnetización sobre los organismos vivos. Una de las hipótesis más difundidas considera que el sitio de impacto del campo electromagnético (CEM), está en la membrana plasmática debido a la anisotropía diamagnética de las moléculas de fosfolípidos. Estas moléculas modificarían su orientación bajo los efectos de un campo magnético y como consecuencia, el  $\text{Ca}^{++}$  ligado a componentes de ácido síalico del glicocalix en la superficie extracelular y a moléculas de fosfatidil serina de la hemicapa intracelular, es liberado por un efecto combinado de repulsión coulumbiana y súper diamagnetismo, (Del Moral y Azanza, 1992; Azanza y col., 1994). Años más tarde el científico Bardasano (2000) esclarece que los fosfolípidos se reorientan por acción del campo magnético adquiriendo una disposición perpendicular a la dirección del campo, mientras que las proteínas lo hacen adquiriendo una disposición paralela, y específicamente, la reorientación que sufren los fosfolípidos puede hacer que los iones calcio dispuestos a ambos lados de la bicapa se aproximen lo suficiente como para sufrir fuerzas de repulsión coulombianas (como ya ha sido confirmado por otros autores), que son mas fuertes que las fuerzas iónicas de los enlaces, en cuyo caso se produciría la liberación de este ion a ambos lados de la membrana y en cantidades iguales. Los iones  $\text{Ca}^{++}$  liberados en el citosol se convierten en los mediadores a nivel molecular de la interacción de los campos magnéticos con las membranas biológicas, como segundo mensajero bioquímico (Azanza, 1992; Azanza y col., 1994; Bardasano, 2000). Azanza y Del Moral, (1992), demostraron que al aplicar CME en una neurona determinada puede producir un incremento en la concentración del calcio diez veces la de la célula normal en reposo. Pessina y col. (2001), reportaron que campos electromagnéticos pulsantes de 50 Hz incrementaron significativamente el calcio de  $143 \pm 46$  nM a  $278 \pm 125$  nM, en células humanas (astrocitomas), así se corroboró que el campo magnético actuó sobre la concentración de calcio extracelular, intracelular, almacenado o sobre la membrana

celular. Se señala que los efectos del campo magnético mediados por el calcio deben tener influencia en el funcionamiento del metabolismo celular como división y proliferación celular, permeabilidad de la membrana, transporte iónico (bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), funciones enzimáticas, excitación neuronal, función exocrina y endocrina, liberación de neurotransmisores, contracción muscular (Azanza, 1992; Azanza y col., 1994; Bardasano, 2000).

Está siendo aceptado que el campo magnético directo y pulsante afecta la distribución de proteínas de membrana (Mac Lauglein y col., 1981; Lee y col., 2001). Bersani y col. (1997,1999) determinaron por microscopía electrónica que el campo magnético pulsante de 50 Hz, aplicado por mas de dos horas a fibroblastos NIH 3T3, produjo un significativo agrupamiento en la distribución de las proteínas intramembrana (PIM) comparado con las células controles no expuestas. Fernández (1998), aseveró que el efecto señalado sobre la membrana es producido por la fuerza del campo magnético sobre las proteínas cargadas, y existe la posibilidad de que dichas fuerzas puedan cambiar su forma alterando su función enzimática en las reacciones químicas y produciendo cambios en los canales que controlan el flujo de iones a través de la membrana.

En el caso de la enzima ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , mayoritaria en la membrana celular, puede sufrir variaciones y propicia cambios en la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , por tanto en el transporte de estos iones (Bardasano, 2000, Zhadin, 2001). Trabajos reportados por Chiabrera y col. (1984) y Fernández (1998), han propuesto que el campo magnético de frecuencia extremadamente baja afecta la acción de ligandos con receptores de membrana y por consiguiente el transporte de iones en células de animales de laboratorio. Stange y col., (2002), demostraron que campos magnéticos de 50 y 60 Hz con intensidades entre 0,00001 y 0,0001 alteraron el movimiento de iones a través de la membrana celular en células radiculares de *Vicia faba L.*; favoreciéndose este hacia el exterior de las células.

Diferentes científicos como Bersani y col. (1999) han reportado los efectos del campo magnético sinusoidal de 50 Hz y 0,002 de intensidad sobre queratocitos humanos, demostrando efectos sobre el crecimiento celular e incremento en la expresión de marcadores de diferenciación celular y de adhesión celular (Integrina  $\beta 4$ ) en la

membrana celular. En este caso muchas células modificaron su patrón de diferenciación y adhesión celular, lo que confirma algunas hipótesis, sobre campos de 50 Hz que modifican la morfología de la membrana celular y los mecanismo de adhesión celular (Manni y col., 2002).

Hay experiencias que indican la existencia de otras vías de interacción de los campos magnéticos al estimular la biosíntesis de proteínas y la transcripción del ADN. Exposiciones de células a campos magnéticos de muy baja frecuencia o energía condujeron a un aumento en la biosíntesis celular (Goodman y col., 1993, 1994, 1995). Blank y col. (1992) encontraron que los campos magnéticos, al igual que los eléctricos con similar amplitud, frecuencia y tiempo de dependencia estimulan la transcripción del ADN; específicamente, Blank y Soo (1996) señalaron que la intensidad magnética de 0,000008 T. estimula la transcripción del ADN, al realizar estos experimentos en cultivos de células HL60 (en suspensión). No obstante, se ha podido demostrar que los campos magnéticos de baja frecuencia, a diferencia de los campos eléctricos, pueden penetrar la célula, pudiendo ser transducidos por la membrana citoplasmática a través de una cascada de enzimas donde se encuentran mensajeros bioquímicos secundarios que pueden reactivar el núcleo y causar cambios en el ADN. Los estudios desarrollados por Blank (1995 a) sobre los efectos directos del campo electromagnético sobre la enzima ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la bomba iónica en la membrana celular, mostraron que el factor mas importante para la transducción de la señal está en el nivel de activación de esta enzima y puede ser explicada por un modelo donde su actividad aumenta a medida que hay mayor concentración de cargas en movimiento en la molécula (Blank y Soo, 1996).

Se deducen dos hipótesis (Blank y Goodman, 1997) para explicar la acción de los campos magnéticos sobre la biosíntesis de proteínas y específicamente sobre la transcripción del ADN: 1) la de la cascada enzimática, iniciada por la acción del campo magnético en la membrana celular y subsiguiente posible mecanismo de transducción de la señal hasta llegar al núcleo, 2) el efecto directo del campo magnético sobre el ADN, sin necesidad de que participe la membrana celular para la transducción de la señal. Se sugiere que la amplificación de los signos transduccionales se realiza con el movimiento de cargas intramoleculares, como pudiera ser el movimiento de cargas en el ADN por el

gran flujo de electrones, activándose de esta manera los genes para la biosíntesis; aunque ninguna de la hipótesis explica como el ADN puede ser desestabilizado para iniciar la transcripción. Ensayos desarrollados con la aplicación de EM-ELF (60 Hz e intensidades de 0,5 a 2,5 ) sobre sistemas modelos de secuencia definida *in vitro*, no afectaron la fidelidad de las enzimas ADN y ARN polimerazas en su participación catalítica para la síntesis del ADN y ARN respectivamente; existiendo estabilidad en los procesos de transcripción, síntesis y reparación del ADN (Harada y col., 2001).

Los estudios más relevantes publicados hasta la fecha (Azanza, 1992; Blank y Goodman, 1997; Fernández 1998; Bersani y col., 1999; Bardasano, 1999, 2000; Zhadin, 2001; Maercker y col., 2003) resumen los efectos de magnetización de la siguiente manera: estimulación primaria de las células a través de la membrana celular y subsiguiente activación de las rutas de señalización mediante la acción sobre fosfolípidos, PIM, flujo de iones (bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), por activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; a nivel del citoplasma, la activación de las funciones metabólicas, de la proteína quinasa C como un punto central en la trasmisión de la señal y por la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{++}$ , que a su vez es liberado por los cambios producidos en la membrana celular por fuerzas de repulsión coulombianas, y a nivel del núcleo celular, la transcripción del ADN por acción sobre cargas móviles (flujo de electrones) en la molécula de ADN.

### *Efectos inmunológicos*

Dentro de los efectos metabólicos que pueden producir los campos magnéticos está su acción sobre el sistema inmune. Para ello se han aplicado diferentes aproximaciones como: respuestas de células productoras de anticuerpos, inmunidad celular (subtipos de linfocitos T), y otras células importantes en la inmunidad, comportamiento de la hipersensibilidad retardada, resistencia a infecciones (Fernández, 1998).

Huang y col. (1977) informaron que la radiación de hámsters chinos con microondas de 2450 MHz les produjo un aumento en la transformación blástica de linfocitos; Bermothly (1963) encontró cambios en el conteo de leucocitos de ratones tratados

magnéticamente. Años después, monos expuestos a campos de 0,2; 0,7 y 2 durante 63 a 67 horas, también registraron cambios en los conteos de las células blancas (Bacttolectti, 1981).

Klassem (1982) reportó que el agua tratada magnéticamente (ATM) provoca un aumento en el número de linfocitos mejorando así la defensa del organismo. En 1984, Theriforde y col. realizaron experimentos con ratones expuestos por 6 días al campo magnético estático; no se produjeron efectos sobre la proliferación de linfocitos estimulados mitogénicamente. Sin embargo, Chiabrera y col. (1984) demostraron la utilidad del campo magnético para la reactivación eléctrica y química de linfocitos por acción del campo eléctrico inducido en las células, mientras que otros científicos aplicaron EM-ELF en linfocitos humanos provenientes de pacientes jóvenes y adultos, logrando aumentar los efectos sobre linfocitos (Bersani y col., 1989a; Cadosi, 1991; Bersani y col., 1998b). Mevissen y col. (1998) demostraron que la exposición de ratas Sprague Dawley a un campo magnético de 50 Hz y 0,0001 indujo efectos en la respuesta mitogénica de células T, ya que produjo estimulación junto a la concavalina A, cuando el tiempo de exposición fue de dos semanas, al aumentarlo a cuatro semanas de exposición se inhibió parcialmente el efecto mitogénico de los linfocitos T y con un tiempo de ocho semanas de exposición hubo tolerancia a la acción del campo magnético.

En el timo, bazo y ganglios linfáticos, durante la acción del campo magnético se observó cambios en la proporción de linfocitos B y T, lo que tuvo relación con el aumento en la producción de anticuerpos (Colectivo de autores, Tribuna Medica, 1989). Elekes y col. (1996) observaron que la aplicación de microondas de amplitud modulada de 50 Hz indujeron elevación del índice esplénico en ratones Balb/c (15 %) y el número de células productoras de anticuerpos (55 %) en el bazo de los ratones machos.

Walleczck y Budinger (1992) asociaron los efectos de activación de linfocitos al calcio presente después de un reto mitogénico, donde la concentración de este empieza a ser modificada, y se produce un aumento por frecuencias específicas de campos magnéticos, estos hallazgos se consideran compatibles con los efectos inmunológicos obtenidos al aplicar campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja. Los trabajos desarrollados por Yost y Liburdy en el mismo año y por Lynstron y col. (1993),

demonstraron estos efectos al exponer timocitos de ratas activados con concavalina A; después de 60 horas de tratamiento, el calcio presente aumentó y se manifestó la actividad mitogénica de estas células, mientras que timocitos inmaduros permanecieron inalterados. Eichwald y col (1996) estudiaron los efectos del ion calcio sobre la regulación de células del sistema inmune, y encontraron que se pueden presentar efectos de estimulación e inhibición de la proliferación celular en función de la activación celular que se logre, lo que depende de la señal específica que regula la dinámica del calcio en la célula, si se asume que éste es controlado por la presencia de un sistema enzimático sensible al campo magnético y lo activa la entrada de calcio a la célula, modulación que puede afectar los procesos dependientes del calcio.

Las investigaciones desarrolladas con células de la sangre al aplicar diferentes tratamientos magnéticos, también demuestran la estimulación de otros leucocitos (Sans, 1995). Kraasnow (1991) encontró un aumento notable en el número de macrófagos tisulares después de aplicarles radiaciones electromagnéticas; específicamente en animales de laboratorio se observó la activación de células de Kupffer (macrófagos hepáticos). Coincidentemente, Bazón y col., (1993) obtuvieron un incremento en el número de monocitos y de células de Kupffer en estudios sobre hepatitis viral en humanos, donde se aplicó campo magnético de frecuencia extremadamente baja.

Seze y col. (1993) lograron aumentar la citotoxicidad de las células Natural Killer en ratones a los que se les aplicó un campo magnético pulsante de 0,12 (0,8 Hz) durante cinco y diez horas cada día. Picazo y col. (1994) publicaron los resultados obtenidos al hacer un estudio completo del comportamiento de las células de la sangre en animales de laboratorio expuestos a 0,0004 a 50 Hz durante seis semanas. No se detectaron diferencias en el hematocrito, para los grupos experimentales en relación con los controles, ni en el conteo diferencial de leucocitos, referente a neutrófilos, eosinófilos y basófilos. No hubo modificaciones en las células sanguíneas ni en su tamaño y morfología, pero si se registró una disminución en el número de leucocitos totales, relacionada con la disminución de linfocitos pequeños, medianos y grandes, y de monocitos sanguíneos en relación con el control donde no se aplicó tratamiento magnético. En exposiciones de humanos jóvenes adultos a un campo magnético

linealmente polarizado de  $0,00001$  y 50 Hz durante 24 horas y de forma intermitente por una hora, abriendo y cerrando el campo cada 15 segundos no se produjeron en ninguno de los casos alteraciones en la concentración de hemoglobina, hematocrito, células rojas, plaquetas, leucocitos totales, conteo diferencial de leucocitos, sub poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , células NK y células B por lo que estas exposiciones de campo magnético no afectaron las funciones hematológicas ni inmunológicas en estas personas (Selmaoui y col., 1996).

Un indicador sensible de perturbaciones por factores externos es la red inmunorregulatoria con la producción de citoquinas. Cossariza y col. (1989) reportaron datos que sugieren que un campo electromagnético pulsante aplicado por largo período de tiempo aumenta la producción de IL-2 en linfocitos de donantes adultos, así como la proliferación de estas células. Estudios posteriores (Cossariza y col., 1993) demostraron que pulsos de inducciones electromagnéticas incrementaron la producción de IL-1 e IL-6 en células mononucleares de sangre periférica humana. Pissina y col. (1997) evaluaron los efectos de las exposiciones a ciclos muy cortos de campos magnéticos estáticos y pulsantes sobre la eventual inducción de citocinas pro inflamatorias y factores de crecimiento provenientes de células mononucleares periféricas de sujetos normales, así como los efectos sobre la proliferación de estas células, pero no hubo inducción en la proliferación de células mononucleares periféricas ni en la producción de citocinas, posiblemente porque se necesitan exposiciones más largas al campo magnético. Sotang (2000) reportó los efectos en la modulación de la producción de citocinas en células HL-60 expuestas a corrientes eléctrica de baja frecuencia. Con el uso de diferentes frecuencias de corriente se obtuvo aumento de  $TNF\alpha$ , IL- $1\beta$ , e IL-8 no así de IL-6, mientras que la aplicación de campos magnéticos de 50 Hz y 60 Hz de inducción magnética de  $0,0001$ , aplicado por un día, una y dos semanas en leucocitos esplénicos de ratas SPD, no indujeron efectos en la producción de IL-1 (Haubler y col., 1999). Contradictoriamente, Simko y col. (2003) reportaron la producción de IL-1 en monocitos bajo la acción de un campo magnético de 50 Hz y  $0,01$ . Por otro lado, la aplicación en CMNPs humanas de campos magnéticos linealmente polarizado, vertical, circular y elíptico, con frecuencias de 50 y 60 Hz e inducciones de  $0,000002$ ;  $0,00002$ ;

0,0001 y 0,0005 para el campo vertical y de 0,0005 para el campo rotacional, no indujeron cambios en la actividad citotóxica de células NK, ni en la producción de citocinas como  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF } \alpha$ , IL-2, e IL-10 (Ikeda y col., 2003). Bardasano (2000) propuso que el sistema inmune muestra una respuesta bifásica bajo la acción de determinadas longitudes de ondas (radiofrecuencias, infrarrojo), mientras que para los campos de frecuencias extremadamente baja se produce estimulación.

### *1.3.2. Aplicaciones médicas del campo magnético*

Las primeras aplicaciones del campo magnético se describen en el libro de Diurvil (citado en Klassem, 1982), se dan a conocer las observaciones del físico ginebres sobre la utilización del agua tratada magnéticamente (ATM) en decenas de pacientes para el tratamiento de lesiones digestivas, cicatrización de heridas y en un primer intento para lograr un efecto psicoterapéutico. Basándose en los cambios que produce el ATM, en la primera parte de la década de los setenta, Shinkus y col. y Pilipenko (citado en Klassem, 1982), dan a conocer la utilizaron en procesos de urolitiasis y para la normalización de la presión arterial, mientras que Utejin y Sochi (citado en Klassem, 1982) utilizaron agua de mar tratada magnéticamente para usos bactericidas y médicos en general, dan las primeras informaciones sobre la posibilidad de tratamiento de la arterosclerosis con ATM.

Denitskaya y Chesnoskova (citado en Klassem, 1982), aplicaron tratamiento magnético a la solución de Ringer con campos entre 6,419 y 8,064 a una velocidad de flujo de 0,4 m/s; obtuvieron mejorías en el trabajo del corazón, también señalaron la influencia del tratamiento magnético en varios medicamentos utilizados para las alergias.

Años después se incorporó al tratamiento de enfermedades, el uso del CME. Ivanov y col. (1990) aplicaron tratamiento magnético con CME para controlar la hipertensión arterial. Zubina Liv (1990) logró éxitos en la atrofia del nervio óptico. En 1991, Kraasnow y col. aplicaron la magnetoterapia en hepatitis virales de tipo A y B en niños, logrando resultados alentadores, mientras que Bazón y col. (1993), la aplicaron a

pacientes adultos, mejoraron así los estados de inmunodeficiencias al activar linfocitos T y macrófagos, además de obtener una buena respuesta de anticuerpos.

Ha sido evidente la utilidad de la magnetoterapia como tratamiento principal en enfermedades como la osteoartritis, espándilo artritis, coxartrosis, úlceras varicosas, úlceras izquémicas, servicitis, prostatismo, parálisis faciales, traumatismo en deportistas, Síndrome de Raynoud (Bistolfi, 1983; Pallares, 1992; Malmiuno y col., 1995; Parsons y col., 1999; Bardasano, 1999, 2000; Salvatore y col., 2003).

Aun quedan numerosas incógnitas y posibilidades para la aplicación del campo magnético en beneficio de la humanidad, y todavía son insuficientes las aplicaciones para mejorar el funcionamiento del sistema inmune.

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Tratamiento magnético**

#### *2.1.1 Equipo para el tratamiento magnético*

En el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, se diseñó y construyó por especialistas del grupo de Bioelectricidad un sistema magnético a imanes permanentes MIPTF de 20 cm de longitud, formado por dos caras polares de polaridades opuestas y la distancia entre ellas variable. Se hizo una caracterización del sistema magnético a través de un Gausímetro Cryotronics INC, de la Lake Shore, modelo 410 HCAT de EE.UU, provisto de un sensor, modelo MSA-410, referido en el Certificado N004-001, emitido por el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado para la caracterización del magnetizador a imanes permanentes MIPTF (Anexo I). De esta caracterización magnética se hizo un gráfico de inducción magnética contra la distancia de separación de las caras polares (Anexo I), y a partir del mismo se determinó el gradiente de campo magnético, el cual resultó ser de 0,01 T/m.

#### *2.1.2 Solución CM-95*

La Solución CM-95 se elaboró a partir de sales de cloro y sodio a una concentración entre 0.1 y 2 % en agua destilada. Esta se envasó por filtración y luego se esterilizó en una autoclave ICEM, producida por la Industria Cubana de Equipos Médicos, a 120 °C y a 1 atmósfera de presión. La misma fue conservada hasta su uso entre 25 y 28 °C (Patente 22583,114. Martínez y col., 1999).

La Solución CM-95, se hizo pasar por el equipo descrito en 211, a través de una manguera plástica de 3mm de diámetro, y como resultado se obtuvo una solución con propiedades físico-químicas diferentes, denominada Solución CM-95 tratada magnéticamente. El volumen de solución que pasó

por el imán fue de 1,4 mL y las velocidades de flujo a través de este fueron de 0,2 y 0,3 m/s. Los tiempos de exposición para cada una de estas velocidades fueron de 1 y 0,7 s, respectivamente.

### *2.1.3 Grupos experimentales*

Los grupos tratados fueron denominados de la siguiente forma: un grupo en el que la solución CM-95 fue tratada con una inducción magnética de 0,012 T para una velocidad de flujo de 0,2 m/s (GTM1), otro en el que la solución CM-95 fue tratada con una inducción magnética de 0,05 T para una velocidad de flujo de 0,2 m/s (GTM2), un tercer grupo en el que la solución CM-95 fue tratada con una inducción magnética de 0,08 T para una velocidad de flujo de 0,3 m/s (GTM3) y por último un grupo en el que la solución CM-95 fue tratada con una inducción magnética de 0,12 T para una velocidad de flujo de 0,3 m/s (GTM4). Se formaron dos grupos controles: un grupo control positivo en el que a los animales se les inocula la solución CM-95 sin tratar magnéticamente (GSTM) y otro grupo control negativo en el que a los animales no se les inocula la solución CM-95 (GCN).

## **2.2 Biomodelos experimentales**

### *2.2.1 Ratones*

Se utilizaron ratones isogénicos de la línea Balb/c hembras de 6 semanas, suministrados por el Laboratorio de Modelos Animales (LABEX)<sup>®</sup> de Santiago de Cuba. El peso de estos osciló entre 18 y 20 g, se mantuvieron en cajas plásticas en locales asépticos a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y una humedad relativa de 60-65 % con régimen 12 horas luz y 12 de oscuridad. Se les suministró pienso ratonina y agua acidulada con un pH entre 2,5-2,8 *ad libitum*.

### *2.2.2 Ratas*

Se usaron ratas *Sprague Dawley* (SPD) hembras y machos, con pesos entre 150 y 200 g, suministradas por el Centro Nacional de Animales de Laboratorio de Cuba. (CENPALAB)<sup>®</sup>. Durante los experimentos los animales se mantuvieron en cajas plásticas en locales asépticos a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y una humedad relativa de

60- 65 %. Se le suministro pienso y agua acidulada *ad libitum*.

### 2.2.3. Conejos

Conejos de la raza Nueva Zelanda Blancos (NZB) hembras, con pesos entre 2 y 2,5 kg suministrados por el Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB)<sup>®</sup>, se mantuvieron en jaulas plásticas en condiciones convencionales a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C; la humedad relativa promedio fue de 60- 65 %. Se alimentaron con conejina y agua *ad libitum*.

Los animales fueron transportados según las normas de calidad establecidas por las instituciones proveedora. Al concluir la cuarentena y verificarse el estado de salud de los animales estos fueron seleccionados para el experimento, distribuyéndose aleatoriamente a razón de cinco animales por caja en el caso de ratones y ratas y de dos animales por jaula para los conejos. Su atención se realizó de acuerdo a las normas institucionales establecidas por la Comunidad Económica Europea (1980), y la Norma Oficial Mexicana, NOM, (1996) y según la Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio. Las condiciones higiénicas de los locales, materiales, utensilios y animales de laboratorio se garantizaron con la limpieza y desinfección cada 7 días, siguiendo el procedimiento recomendado en las Normas ISO 10993-2 (1998), ISO 10993-11 (1996) e ISO 10993-12 (1998), para tales experiencias. La eutanasia o sacrificio de los animales se hizo según lo establecido por la norma ISO 10993-11 (1996), con un mínimo de sufrimiento físico y mental.

### 2.2.4-Esquemas de inoculaciones.

Para evaluar los efectos biológicos e inmunológicos de la Solución CM-95 TM en los experimentos desarrollados en ratones Balb/c, se escogieron dos esquemas: el primero en el que se utilizaron 3 inoculaciones diarias con un volumen de 0,2 mL por vía intraperitoneal (I.P.), con una duración de cinco días (Kiho, 1992), denominado *Esquema I*. En el segundo se realizaron dos inoculaciones en los tiempos 0 y 120 minutos, con una duración de 4 horas y 30 minutos, denominado *Esquema II*. El resto de los esquemas de inoculaciones utilizados se describen en cada experimento.

## 2.3 Efectos biológicos de la Solución CM-95 TM

### 2.3.1 *Diseño experimental*

Para conocer los efectos biológicos de CM-95 TM, se hizo un primer experimento referente al transporte de glucosa en intestino de ratas SPD y otros dos para la evaluación de parámetros bioquímicos y hematológicos en muestras de suero y sangre de ratones Balb/c, respectivamente. Para el primer experimento se conformaron los grupos tratados GTM2 y GTM4, mientras que para el segundo y tercer experimento sólo se usó el GTM4. En cada uno de estos experimentos se utilizaron como grupos controles, el GSTM y GCN (tópico 2.1.3).

En el ensayo de glucosa se utilizaron 6 ratas por grupo experimental, mantenidas según el tópico 2.2.2. Para el segundo y tercer experimento se usaron 10 ratones Balb/c, según el tópico 2.2.1.

### 2.3.2 *Transporte de glucosa en intestino de ratas SPD*

Ratas SPD fueron pesadas después de 24 horas de ayuno, se les inyectó pentobarbital sódico a razón de 35 mg /kg. de peso. A los animales anestesiados se les realizó una incisión en forma de V y a partir de esta se midió de 20 a 25 mm de asa duodenal, en la cual se realizó otra incisión de la misma forma que la anterior. Por la incisión superior se introdujo la solución Luck glucosa a 38 °C para lavar el intestino, luego se inyectó por esta misma vía 0,8 mL de la Solución CM-95 TM con las intensidades según cada grupo de tratamiento (GTM2 y GTM4) (ver tópico 2.1.3), sin tratamiento magnético para el grupo GSTM y animales sin tratar para el grupo GCN. Una vez colocadas las vísceras en el interior de cada animal por la incisión en V, esa porción del intestino se bañó continuamente con solución Luck glucosa; a los 30 minutos se extrajo la Solución CM-95 tratada y no tratada magnéticamente según cada grupo experimental de la porción duodenal. Seguidamente, este segmento fue llenado con 0,8 mL de Solución Luck glucosa (1mg /mL) a 38 °C. Pasado los 30 minutos se extrajo la porción intestinal de cada animal, se secó y se midió el volumen recuperado (VR) de la solución, el cual se centrifugó a 3000g durante 5 minutos. En el sobrenadante de cada muestra se determinó la concentración de glucosa, según el método de Somogy Nelson (Pérez y col., 1986).

La eutanasia de los animales se hizo aplicando una sobredosis de pentobarbital sódico.

### *2.3.3 Parámetros bioquímicos y hematológicos*

#### *2.3.3.1 Inoculaciones*

Las sustancias CM-95 TM (GTM4) y no tratada magnéticamente (GSTM) se inocularon en volúmenes de 0,2 mL por vía I.P. en cada animal, según Esquema II (tópico 2.2.4). Los animales del GCN no recibieron ningún tratamiento. A los 150 minutos de la segunda inoculación se hizo sangramiento total de cada ratón por punción cardíaca. A una parte de la sangre obtenida se le añadió anticoagulante EDTA, al 5 %, para los ensayos hematológicos y la otra se conservó a 4 °C para los ensayos bioquímicos.

#### *2.3.3.2 Obtención del suero*

Después de incubar la sangre obtenida a 4 °C durante 1 hora, se eliminaron los eritrocitos por centrifugación a 1 800g durante 10 minutos. Se recogió el suero en el sobrenadante y se conservó a 4 °C hasta su uso para los ensayos bioquímicos.

#### *2.3.3.3 Ensayos bioquímicos y hematológicos*

Las muestras obtenidas (suero y sangre) se trasladaron al Centro de Toxicología y Biomedicina de Santiago de Cuba (TOXIMED)<sup>®</sup> donde se realizaron los ensayos bioquímicos y hematológicos, según los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) establecidos en TOXIMED, en 1998, para la determinación de proteínas totales (PNT No. 22), glucosa (PNT No. 25), iones sodio (PNT No. 26), iones potasio (PNT No. 27) e iones calcio (PNT No. 28), conteo total de leucocitos (PNT No. 20), conteo diferencial de leucocitos (PNT No. 21), hemoglobina (PNT No. 18), hematocrito (PNT No. 19).

## **2.4. Respuesta Inmune humoral**

### *2.4.1 Diseño experimental*

Para conocer los efectos de la Solución CM-95 TM en la respuesta inmune humoral, se evaluó la dinámica en el título de anticuerpos específicos para antígenos bacterianos. Para ello se desarrollaron diferentes esquemas de inmunización. Los tres primeros se

realizaron en ratones Balb/c (experimentos 1; 2 y 3), se utilizaron las vías de inoculación I.P., S.C. e I.V., con 10 animales por grupo experimental. El cuarto esquema (experimento 4) se llevó a cabo en Conejos NZB (6 por grupo experimental), la inoculación fue I.V.

Los grupos experimentales fueron conformados por GTM1, GTM2, GTM3 y GTM4 como grupos de tratamiento para los esquemas en ratones Balb/c y solo el GTM4 para el esquema en conejos (según tópico 2.1.3) y los grupos controles con adyuvantes convencionales, GCP1 (Hidróxido de Aluminio), GCP2 (Adyuvante de Freund), además del GCP (antígeno sin adyuvante) y GCN (animales sin inocular), excepto para los esquemas por vía I.V. que no se utilizaron grupos controles con los adyuvantes convencionales.

Posteriormente, se ensayó el uso de la Solución CM-95 TM como adyuvante inmunológico para la obtención de seis sueros policlonales anti- *Bacillus* en Conejos NZB (experimento 5). Al finalizar el esquema de inmunización del experimento 1, desarrollado en ratones Balb/c por vía I.P, se determinaron para el grupo GTM4 y todos los grupos controles, el Isotipo IgG y las subclases IgG1 e IgG2a producidos.

## 2. 4.2. Esquemas de inmunización

### 2. 4. 2.1 Animales

Se utilizaron ratones Balb/c y conejos NZB, según las condiciones explicadas en los tópicos 2.2.1 y 2.2.3, respectivamente.

### 2.4.2.2 Preparación de los antígenos

Las bacterias *Bacillus cereus* ATCC 11778 (experimentos 1; 3 y 4) *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13431, *Bacillus pumilis* ATCC 14884 *Bacillus megaterium* ATCC 4234, (experimento 5) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5437 serotipo 350 (experimento 2) fueron sembradas en caldo nutriente (Merck) e incubada a 37 °C durante 18 horas. Al término de este tiempo se hizo una suspensión bacteriana para las del género *Bacillus* con solución salina fisiológica estéril, luego se colocaron al calor por 2 horas a 100 °C. A las bacterias de la especie *Pseudomonas aeruginosa* se les añadió formaldehído (Fluka) al 2 %, y se les mantuvo en esta

suspensión por espacio de 2 horas. A continuación las células se lavaron 3 veces por centrifugación a 1 800g durante 10 minutos con salina fisiológica estéril, se ajustó su concentración celular, según las exigencias de cada esquema de inmunización por lectura a una densidad óptica de 660 nm, en un Espectrofotómetro Pharmacia. En el experimento II, además se utilizó el LPS de la cepa referida de *Pseudomonas aeruginosa*, obtenido por el método de Fenol Acuoso (Cobas y col., 1997). Para la preparación del antígeno polivalente del género *Bacillus sp* se hizo un pool de todos los antígenos somáticos de las cepas de bacilos escogidas.

#### 2.4.2.3. Adyuvantes

*Solución CM-95TM*: Se preparó según tópico 2.1.2 para el tratamiento magnético a la Solución CM-95 en cada grupo experimental GTM1, GTM2, GTM3, GTM4 (experimentos 1, 2 y 3), GTM4 (experimento 4) con las inducciones magnéticas referidas en el tópico 2.1.3. Para los sueros policlonales anti-Bacillus se trató la Solución CM-95 con inducciones magnéticas de 0,12 T en todos los grupos (G1 (*Bacillus sp*), G2 (*Bacillus subtilis*); G3 (*Bacillus thuringiensis*) G4 (*Bacillus cereus*); G5 (*Bacillus pumilis*) y G6 (*Bacillus megaterium*).

*Hidróxido de Aluminio* (Berhing Warke AG, Alemania): fue utilizado en forma de gel a una concentración de 4 mg/mL (grupo GCP1).

*Adyuvante de Freund Completo e Incompleto* (Sigma)<sup>®</sup>: se usó en emulsión con el antígeno a la concentración comercial (grupo GCP2).

Los adyuvantes fueron inoculados volumen a volumen (v/v) con el antígeno.

#### 2.4.2.4 Inmunizaciones

Para cada experimento se utilizó un protocolo de inmunización diferente. En el primero, vía I.P., (Reid y col., 1991) se inoculó el antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus* en concentraciones de  $2 \times 10^7$  células/mL para la primera inoculación y de  $1 \times 10^7$  células /mL, para las tres inoculaciones restantes, en un volumen de 0,2 mL por animal, cada 15 días, en la cavidad peritoneal. El booster se aplicó a los 48 días sin adyuvante. A los 51 días se sacrificaron los ratones en Cámara de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos.

Para el experimento 2 (vía S.C.), se inocularon 0,2 mL del antígeno somático de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración de  $1,5 \times 10^9$  células/mL cada 15 días hasta completar dos inoculaciones en diferentes puntos de la región dorsal. Se hicieron dos booster, y se inoculó el LPS de la bacteria *P. aeruginosa* a una concentración de 200 g/mL, los días 25 y 35 del esquema. A los 51 días se sacrificaron los animales (Esnard y col., 1992).

El esquema de inmunización del experimento 3, tuvo una duración de 17 días (Margni, 1982) y se realizaron 3 inoculaciones cada 3 días de 0,2 mL del antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus* ( $1 \times 10^8$  células/mL) en la vena de la cola de los ratones, vía I.V.

El protocolo de inmunización en conejos NZB (Esnard y col., 1992) para los experimentos 4 y 5, incluyó 6 inoculaciones por la vena marginal de la oreja de cada animal (vía I.V), las primeras 5 cada 4 días con una dosis del antígeno somático de  $5 \times 10^9$  células/mL en volúmenes de 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mL, respectivamente. El booster se aplicó a los 4 días de la última inoculación con un volumen de 2 mL, el esquema duró 35 días. En el experimento 4 se utilizó el antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus* y en el 5, los 6 antígenos somáticos de las bacterias del género *Bacillus*, referidas en el tópico 2.4.2.2.

Los antígenos fueron combinados con adyuvantes de acuerdo al grupo experimental en cada esquema de inmunización.

#### 2.4.2.5 Obtención del suero

Sangramientos parciales: Antes de iniciar cada protocolo de inmunización y en el transcurso de ellos se hicieron sangramientos parciales. En el caso de los ratones, se extrajo la sangre por el plexo retroorbital del ojo con el uso de capilares estériles; en los conejos por la arteria central de la oreja. La frecuencia de estos fue de 7 días para los experimentos 1 y 2 (en ratones), de 5 y 7 días para los experimentos 3 (en ratones); y 4 y 5, (en conejos), respectivamente.

Sangramientos totales: Al final de cada protocolo de inmunización referido en 2.4.2.4, se extrajo la sangre por punción cardiaca. En todos los casos para la extracción de los sueros la sangre obtenida se incubó a 4 °C durante 1 hora, los eritrocitos fueron

eliminados por centrifugación a 1 800g durante 10 minutos en centrífuga Hitachi (IMAC). Los sueros se conservaron a 4 °C hasta su uso.

#### *2.4.2.6 Titulación*

La titulación de los sueros obtenidos se llevó a cabo por la técnica de aglutinación en láminas (Roitt y col., 1998). Se hicieron diluciones dobles progresivas de cada suero en solución de NaCl al 0,9 %. De forma paralela se confeccionaron suspensiones concentradas de los antígenos bacterianos, enfrentándose una gota de los mismos con cada dilución de los antisueros. Como controles se utilizaron los antígenos en suspensión, los antisueros y los sueros de animales sin inocular, a los que se le añadió una gota de solución salina fisiológica y se procedió de la misma forma que para las muestras. El título fue expresado como el inverso de la dilución hasta la cual se observó la reacción de aglutinación positiva y los resultados referidos como 2-log de los títulos correspondientes.

#### *2.4.2.7 Isotipos de anticuerpo*

##### *2.4.2.7.1 ELISA isotipo IgG*

La concentración de IgG se determinó por la técnica de ELISA (Sotolongo, 1996). Placas de poliestireno de 96 pozos, de fondo plano (Maxisorp, Nunc, E.U.), se recubrieron con 100 µL de la suspensión de cultivo de la cepa *Bacillus cereus*, incubándose a 4 °C durante toda la noche. Luego se añadieron 100 µL de las muestras de suero (experimento 1) de cada grupo experimental, (GTM4, GSTM, GCP, GCP1, GCP2 y GCN, diluidas 1:100 en TBS /Tween 20 (Sigma® S.T.M.O, E.U.) con BSA y los controles durante 1 hora a 37 °C. Como conjugado se utilizó anti-IgG de ratón (Pharmigen) diluido 1:5 000 en la misma solución que las muestras. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C. Se añadió 100 µL /pozo de buffer sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka) 0,15 % con O-felinendiamina (Sigma®). La reacción se detuvo a los 30 minutos con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) 2M y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm en el lector de Micro- ELISA (Titertek Multiskan). La concentración de la muestra

es proporcional a la señal como resultado de la hidrólisis del sustrato.

#### 2.4.2.7. 2 ELISA: subclases de IgG

Para determinar las subclases de IgG presentes en los sueros fue utilizado un ELISA de amplificación biotina –streptavidina. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp Nunc, E.U.), las que se recubrieron con 100  $\mu$ L de la suspensión de cultivo de la bacteria *Bacillus cereus* en tampón de recubrimiento. Se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Las muestras de suero (experimento 1) de cada grupo experimental se añadieron a una dilución de 1:100 en TFS /Tween 20 con BSA y se incubaron 2 horas a 37 °C. Luego se añadió el conjugado anti IgG1 o IgG2a biotinilado de ratón (Sigma)<sup>®</sup> según correspondió para cada isotipo, incubándose 2 horas a 37 °C con una dilución 1:1 000. Posteriormente se añadió streptavidina (Sigma)<sup>®</sup> diluida 1:2000 incubándose 1 hora a 37 °C, como sustrato se utilizó 100  $\mu$ L/pozo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,15 % con O-fenilendiamina (Sigma)<sup>®</sup> y se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm en lector de Micro-ELISA (Titertek Multieskan). Seguido a cada paso de incubación de las muestras se realizaron lavados con TFS /Tween 20 (Sigma)<sup>®</sup>.

## 2.5 Respuesta Inmune mediada por células

### 2.5.1 Diseño experimental

Los efectos de CM-95 TM en la respuesta inmune celular se evaluaron a través de diferentes elementos como: proliferación de CMNPs humanas cultivadas *in vitro* (experimento 1), comportamiento del número de macrófagos peritoneales con CM-95 TM inoculada junto a un antígeno y sin antígeno, en un esquema de inmunización por vía I.P. (experimento 2), así como la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal en un esquema de cinco días (experimento 3) y en un esquema de dos inoculaciones (experimento 4), la fagocitosis de levaduras al seguir un esquema de dos inoculaciones (experimento 5), hipersensibilidad retardada (HRT) con el antígeno BSA al 1 % (experimento 6) y producción de INF $\gamma$  e IL-5 (experimento 7). Se utilizaron 10 ratones de la línea Balb/c por grupo experimental (tópico 2.2.1), excepto para el experimento 1,

donde se utilizaron células mononucleares humanas de sangre periférica (CMNPs). Se conformó el GTM4 como grupo de tratamiento para los experimentos 1; 2; 3; 4; 5 y 7 y los grupos controles GSTM y GCN (según tópico 2.1.3), además se utilizaron otros grupos controles positivos como BCG (Sigma)<sup>®</sup> en el experimento 3 y los grupos GCP (antígeno), GCP1 (hidróxido de aluminio), GCP2 (Adyuvante de Freund) en el experimento 2. En el experimento 6 (HRT), se utilizaron diferentes combinaciones de la Solución CM-95 de la siguiente forma: CM-95 TM – BSA, CM-95 TM (grupos de tratamiento); CM-95 STM-BSA, CM-95 STM; (grupos controles), además de los otros controles: NaCl 0,9 % -BSA y NaCl 0,9 %.

### *2.5.2 Índice de Estimulación en CMNPs humanas*

#### *2.5.2.1 Separación de CMNPs humanas*

La separación de células mononucleares periféricas (CMNPs) se realizó a partir de 20 mL de sangre periférica de voluntarios sanos colectada en 2 mL de EDTA al 5 % y diluida 1:10 en solución salina tamponada con fosfato (TFS) 10X. Se retiró el plasma por centrifugación a 300g durante 10 minutos. El precipitado celular fue resuspendido en 30 mL de PBS 10X. Las células de la sangre periférica (PBL) fueron separados por centrifugación en un gradiente de densidad con el uso de Ficoll-Hypaque (Fharmacia, UK) a 250 g durante 30 minutos a 4 °C en centrífuga Hitachi (IMAC); luego se retiró la banda de blancos y se añadió en un tubo cónico que contenía 30 mL de PBS (solución salina tamponada a 4 °C). Los PBL aislados fueron lavados y resuspendidos en 20 mL de PBS con 5 mL de RPMI 1640 (GIBCO-BRL, E.U.) suplementado con suero fetal bovino, se ajustó su concentración a  $5 \times 10^6$  células/mL con solución de toluidina 1:10. La viabilidad celular se estimó mediante conteo en cámara de Neubauer (Fein Optic, Jena, Alemania) en Microscopio Olympus (Modelo DMLB y CH2) a 1000x por el método de exclusión con azul tripano.

#### *2.5.2.2 Cultivo de células “in vitro”*

El cultivo de células se desarrolló en placas de 96 pocillos Nudon Surface (Maxisorb immunoplate, Nunc Denmark) se le añadieron 100  $\mu$ L de células, 50  $\mu$ L de Fitohemaglutinina (PHA) 100  $\mu$ g/mL en dilución 1:100 y 50  $\mu$ L de CM-95 con

tratamiento o sin tratamiento magnético (GTM4, GSTM respectivamente) para un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  por pozo. El volumen de CM-95 fue sustituido por medio RPMI 1640 en el control (GC). Para el control correspondiente de cada grupo se sustituyó el volumen de PHA (50  $\mu\text{L}$ ) por el medio RPMI 1640. La proliferación celular fue medida por incorporación de timidina tritiada (Amersham, England). Se administró 1  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina / pozo durante 1 hora previo a la incubación de las células a 37  $^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  y 85 % de humedad relativa durante 72 horas. El medio fue removido de cada pozo, las células lavadas y colectadas en papel de fibra de vidrio (Whatman) y secadas durante 2 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Se determinaron las cuentas por minutos de cada muestra en un Contador LKB 1209 Rackbeta (Dantos y col., 1999; Gerard y col., 2000). Los resultados se expresaron como:

$$IA = \frac{C_{pm(muestra)}}{C_{pm(control)}}$$

donde IA es el índice de estimulación.  $C_{pm(muestra)}$  es el conteo por minuto en la incorporación de Timidina Tritiada con PHA en las muestras para GTM4, GSTM, y GC.  $C_{pm(control)}$  es el conteo por minuto en la incorporación de Timidina Tritiada sin PHA para el control correspondiente a cada uno de estos grupos.

### 2.5.3 Macrófagos

#### 2.5.3.1 *Conteo de macrófagos en el exudado peritoneal*

Los macrófagos fueron extraídos de la cavidad peritoneal al final de los esquemas de inoculaciones desarrollados en el experimento 2 (tópico 2.4.2.4), experimento 3 (según Esquema 1. mostrado en el tópico 2.2.4) y experimento 4 (según Esquema 2, tópico 2.2.4) siguiendo la técnica de Kiho (1992). Para ello se inocularon de 3 a 4 mL de PBS-BSA (solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 suplementado con seroalbúmina bovina BDH estéril a 4  $^{\circ}\text{C}$ ) para obtener las células peritoneales, las que después de extraídas se lavaron con la misma solución tres veces, y se centrifugaron a 1 500g durante 10 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  en centrífuga refrigerada (Hitachi IMAC). El sedimento obtenido se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA, la concentración se determinó en cámara de Neubauer utilizando cristal violeta al 1 %, el conteo de células

se efectuó en microscopio Olympus (Modelo DMLB y CH-2) en aumento 400x. El número de macrófagos se expresó, en como 10<sup>6</sup> células/ratón, por la relación:

$$N^{\circ} \text{ de macrófagos} = \frac{N^{\circ} \text{ de Células / mL} \times \text{volumen de la suspensión} \times \text{dilución}}{N^{\circ} \text{ de ratones}}$$

### 2.5.3.2 Actividad de la enzima lisosomal fosfatasa ácida en macrófagos

Se ajustó la concentración de los macrófagos obtenidos a partir del exudado peritoneal, en cada grupo experimental (2; 3 y 4) a 1 x 10<sup>5</sup> células/mL en RPMI 1640 (GIBCO) en cámara de Neubauer. La suspensión celular se centrifugó y se añadió al precipitado 0,1 mL de Tritón X-100 al 0,1 % para solubilizar, 0,5 mL de 1-Nitrofenil fosfato como sustrato y 0,4 mL de tampón citrato 0,1 mol/L (pH 5,0). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. A continuación se agregó 1 mL de tampón borato 0,2 mol/L (pH 9,8) y se determinó la absorbancia a 405 nm en Espectrofotómetro Pharmacia. La actividad enzimática se expresó como nanomoles de paranitrofenil fosfato liberados por 1x10<sup>5</sup> macrófagos en 60 minutos (Kiho, 1992).

### 2.5.3.3 Fagocitosis

Se realizó una modificación a la técnica de Sherry y col. (1996). Ratones Balb/c inoculados por vía I.P. con dos dosis de CM-95 (Esquema 2; 2.2.4) con o sin tratamiento magnético para los grupos GTM4 y GSTM, respectivamente, recibieron a los 150 minutos de la segunda inoculación, 0,5 mL de células de *Saccharomyces cerevisiae* CB-09 suspendidas en NaCl 0,9 % (Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba) y ajustadas a la concentración de 4x10<sup>6</sup> células/mL. Transcurrida 1 hora se colectaron las células peritoneales con PBS-BSA 1 % a 4 °C. Las células fueron lavadas 3 veces por centrifugación a 1 500g durante 10 minutos para eliminar las levaduras que no fueron fagocitadas. Se procedió luego al conteo celular en cámara de Neubauer para determinar en 100 células el porcentaje de fagocitosis y el índice fagocítico, según la expresión (Pico y col., 1997).

$$IF = \frac{N}{100},$$

donde IF y N son el Índice Fagocítico y el número de levaduras fagocitadas, respectivamente.

#### 2.5.4 Hipersensibilidad retardada

Para la Hipersensibilidad Retardada (HRT) se aplicó la técnica descrita por Tegerday y Lacetera (1991), Smith (1996). Ratones de la línea Balb/c se inocularon por vía S.C. (zona cérvico dorsal) en el tiempo 0 y a los 14 días con 0,2 mL del antígeno BSA al 1 % o sin este en diferentes combinaciones como se describen en el tópico 2.5.1. Cuando se inoculó el antígeno unido al adyuvante se hizo v/v y el antígeno (BSA), el adyuvante (CM-95 TM o STM) o Na Cl 0,9 % se inoculó en un volumen de 0,2 mL. A los 21 días los animales se retaron con una dosis de 50 µL de BSA (650 g /mL) inoculada en 0,02 mL de NaCl 0,9 % por vía intradérmica (I.D.) en la pata izquierda. En la pata derecha se inoculó igual volumen de NaCl 0,9 % por la misma vía. La HRT se midió a las 24, 48 y 72 horas con el uso de un Pletismómetro 715, UCO Basile, y se expresaron los resultados del edema en mm como:

*Induración de la pata izquierda –Induración de la pata derecha de cada ratón*

Los resultados se llevaron a porcentaje por la siguiente expresión:

$$Edema = \frac{A_1 - B_1}{A_0} 100\% ,$$

donde A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub> corresponden a las induraciones medidas en las patas izquierda y derecha, respectivamente. A<sub>0</sub> es la medida en la pata izquierda de cada animal antes de su inoculación.

#### 2.5.5 Producción de INF $\gamma$ e IL-5 en linfocitos murinos

##### 2.5.5.1 Inoculaciones

Ratones Balb/c fueron inoculados por vía I.P., con dos dosis, según Esquema II (tópico 2.2.4) de la Solución CM-95 TM (GTM4) y sin tratamiento magnético (GSTM). A las 7, 24 y 72 horas de la última inoculación se sacrificaron los animales en Cámara de CO<sub>2</sub> (10 minutos), y se obtuvo la sangre en EDTA 5 % para la separación de los linfocitos.

##### 2.5.5.2 Separación de linfocitos

La sangre de los ratones de cada grupo experimental diluida 1:10 en solución salina tamponada con fosfato (TBS) 10X, se centrifugó a 300g durante 10 minutos para retirar el plasma. El precipitado celular fue resuspendido en 30 mL de PBS 10X. Las células

fueron separadas por centrifugación en un gradiente de densidad con el uso de Ficoll-Hypaque (Fharmacia, UK) a 600g 4 °C durante 15 minutos en centrífuga Hitachi (IMAC). La banda de linfocitos se removió del gradiente y se lavó tres veces con PBS a 1500g por 10 minutos, luego se ajustó la concentración celular a  $2 \times 10^2$  células/mL en una cámara de Neubauer y la viabilidad celular fue estimada por exclusión con tripan azul 5 %, lo que excedió siempre del siempre el 95 %.

#### 2.5.5.3 ELISA de IFN- $\gamma$ e IL-5

Para la realización de este ELISA se utilizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) que fueron recubiertas con 50  $\mu$ L por pocillo de anticuerpos de captura anti-IFN $\gamma$  e IL-5 (Pharmigen), luego se incubó toda la noche a 4 °C. Se realizaron cuatro lavados con TFS-Tween (solución que se utilizó para todos los lavados) y se bloqueó con 100  $\mu$ L de tampón de bloqueo por pocillo, incubándose a temperatura ambiente por 30 minutos. Se lavó tres veces y se procedió a adicionar los sobrenadantes del cultivo de linfocitos y la curva estándar, incubándose la placa durante 4 horas a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces. Se añadieron 100  $\mu$ L por pocillo de anticuerpo biotinilado Hanoi-citocina (Pharmigen) a una concentración de 2  $\mu$ g/mL diluida en tampón de bloqueo con Tween 20. Se incubó una hora a temperatura ambiente y se realizaron seis lavados para añadir posteriormente el conjugado streptavidina-HRP diluido 1:2 000, luego se realizaron ocho lavados. Como sustrato se empleó O-fenilendiamina y se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de SDS, las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm en el lector de MicroELISA (Titertek, Multieskan). Una vez obtenido los resultados del lector de MicroELISA estos se analizaron utilizando el programa Microsoft Excel.

## 2.6 Toxicidad e Inmunotoxicidad

Los estudios de inocuidad (toxicidad e inmunotoxicidad preliminar) de la Solución CM-95 tratada magnéticamente, fueron realizados en el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED)<sup>®</sup> de Santiago de Cuba, según la metodología descrita en la Guía No. 407 de la OECD para la evaluación de toxicidad a dosis repetida.

### *2.6.1 Diseño experimental*

Ratas SPD en condiciones experimentales, según el tópico 2.2.2, después del periodo de cuarentena (7 días), se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos experimentales con 20 animales cada uno (10 hembras y 10 machos), se conformaron 3 grupos con diferentes niveles de tratamiento de la Solución CM-95, y se constituyeron tres niveles de aplicación: Nivel I (0,05 T y 0,2 m/s); Nivel II (0,12 T y 0,3 m/s ) y Nivel III (0,16 T y 0,3 m/s). Los grupos controles fueron GSTM y GCN. Estos grupos conformaron dos experimentos, en el primero se evaluaron los parámetros a los 7 días después del tratamiento de los animales y en el segundo a los 28 días de este.

### *2.6.2 Preparación del producto*

La preparación del producto (Solución de sales CM-95) se hizo según el tópico 2.1.2.

### *2.6.3. Inoculaciones*

La Solución CM-95 tratada magnéticamente (Niveles I, II y III) y no tratada magnéticamente (GSTM) se inoculó por vía I.P. en un volumen de 0,2 mL por animal con una frecuencia diaria, hasta los 28 días. A los 7 días (experimento 1) y 28 días (experimento 2) de aplicado el tratamiento se evaluaron diferentes parámetros.

## *2. 6. 4. Controles realizados*

### *2.6.4.1 Signos clínicos*

Observaciones diarias para conocer signos de diarreas, estrés respiratorio, marcha actitud ante el alimento, pilo erección, saliveo, temblores, convulsiones, ataxia, frecuencia respiratoria inusual, secreciones mucosales diarias.

### *2.6.4.2 Peso de los animales*

Los animales vivos fueron pesados, en gramos antes de comenzar los experimentos; semanalmente durante los ensayos y al final de estos, se comenzó a partir de los 7 días de inoculados. Para ello se utilizó una balanza Sartorio (Modelo LC6200S).

### *2.6.4.3 Índice relativo de bazo y timo*

Los bazos y timos extraídos en la disección de cada animal en los diferentes grupos

experimentales se pesaron, en una balanza Sartorio (Modelo LC 6200S y LC 1200) y se determinó el Índice Relativo al dividir el peso obtenido de cada órgano entre el peso del animal vivo al final de cada experimento.

#### *2.6.4.4 Celularidad de la médula ósea*

Después de la extracción del fémur en cada animal se aplicó la técnica descrita en el PNT No. 36 para celularidad de medula ósea (TOXIMED 1988).

#### *2.6.4.5 Determinaciones hematológicas y bioquímicas*

Para las determinaciones hematológicas y bioquímicas se extrajo sangre a los animales al final de cada experimento (7 y 28 días, respectivamente), por sangramientos parciales, parte de la misma fue utilizada para las determinaciones hematológicas como conteo global y diferencial de leucocitos, el resto se utilizó para las determinaciones bioquímicas como proteínas, glucosa e inmunocomplejos circulantes, todas ellas según Parámetros Normalizados TOXIMED 1998 (PNT. No. 20; 21; 22; 25 y 37, respectivamente).

#### *2.6.4.6 Estudio anatomopatológico*

##### *2.6.4.6.1 Necropsia*

Los estudios histopatológicos macroscópicos y microscópicos se llevaron a cabo con la eutanasia de todos los animales después de su narcosis con una sobredosis de pentobarbital sódico, siguiendo las recomendaciones de la OECD. Luego se procedió al desangrado y necropsia de los mismos (Castillo, 1985; Infante 2000) a las 24 horas de la última inoculación de 7 y 28 días.

##### *2.6.4.6.2 Ensayo anatomopatológico*

En la toma de muestras, los órganos fueron colectados en frascos de boca ancha de color ámbar, los cuales estaban adecuadamente rotulados con el número de estudio, número del animal y grupo. Los órganos se fijaron con solución buffer de formalina al 10 % para las primeras 24 horas, luego se transfirieron a una solución menos concentrada al 4 % para su conservación. Los fragmentos referidos fueron procesados en el Histoquine (Modelo Leyca 2000) (procesador de tejidos) e incluidos en parafina, distribuyéndose en

bloques: Bloque I (riñones, corazón, hígado y pulmón; Bloque II (bazo, ganglios linfáticos y timo); Bloque III (aparato digestivo, intestino delgado y grueso).

*Evaluación macroscópica:* Se hicieron observaciones macroscópicas de los órganos extraídos al final de cada experimento como: bazo, timo, ganglios linfáticos mesentéricos, tejido linfoide asociado a intestino (Placas de Peyer), pulmón, corazón, riñones e hígado. Se examinó el tejido en la zona de inoculación evaluando la posible formación de granulomas macrofágicos.

*Evaluación microscópica:* El análisis histopatológico se realizó procesando las muestras obtenidas de los diferentes órganos por el método de la parafina, fijándolos en formalina neutra (MEDICUBA) al 10 % y coloreándolos con Hematoxilina Eosina, HE, (BDH). Para la observación se usó un microscopio Olympus (DMLB CH-2) en inmersión a diferentes aumentos.

### 2.7 Análisis estadístico

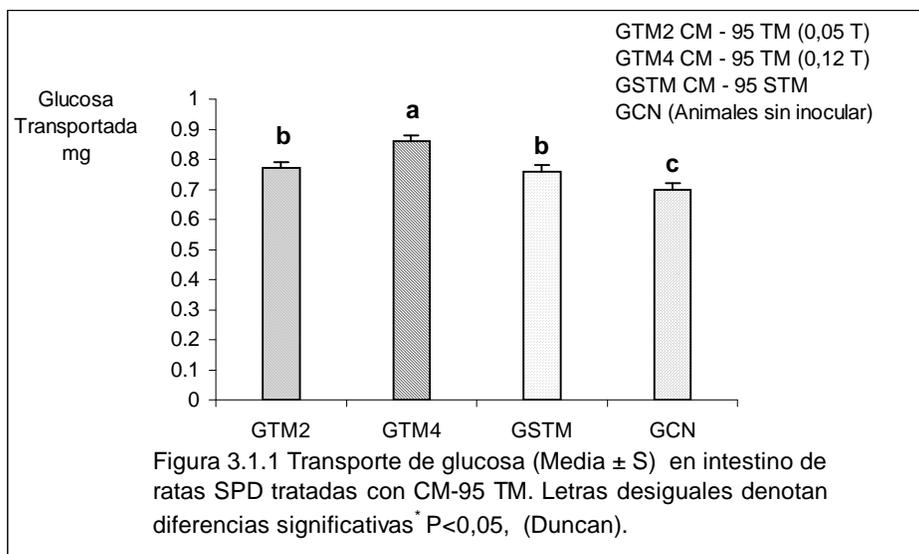
Se realizó la prueba de Kolmogorov- Smirnov, para comprobar si los datos cumplían una distribución normal, y a continuación la prueba de Bartlett o F máxima para comprobar la homogeneidad de varianza. El análisis de varianza ANOVA de clasificación simple, se efectuó con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , para comparar el comportamiento de los grupos en cada experimento y entre ellos. Se aplicó la prueba de comparación de rangos múltiples de DUNCAN, con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , para la comparación de las medias entre los grupos. Para el análisis estadístico de los diferentes resultados se utilizó el paquete estadístico en soporte electrónico SPSS 9,0 para Windows (1999).

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Efectos biológicos de CM-95 tratada magnéticamente

#### 3.1.1 Transporte de glucosa en ratas SPD

El comportamiento en el transporte de glucosa en células del intestino delgado porción duodenal de ratas SPD con CM-95 TM, se muestra en la figura 3.1 para cada grupo experimental: GTM2 (0,05 T), GTM4 (0,12 T), GSTM (CM-95 sin tratamiento magnético) y GCN (animales sin inocular). En esta figura se observa un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) del transporte de glucosa para el GTM4 en comparación con el GTM2, GSTM y GCN, pero a su vez el GTM2 y GSTM presentaron aumento en el transporte de glucosa con respecto al GCN, diferencias que fueron significativas ( $P < 0,05$ ).



Estos resultados indican que la Solución CM-95 TM actuó de forma efectiva en el mecanismo de transporte de glucosa, y es más significativo para la mayor inducción magnética usada (GTM4), lo que pudiera estar relacionado con la activación de la

enzima ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , la que participa en los procesos de transporte de glucosa en el intestino.

La activación de esta enzima puede ser debido al aumento de la permeabilidad de la membrana biológica por la acción del CME, resultado que concuerda con los previamente reportados por Polk y col. (1986); Azanza (1992); Azanza y col. (1994); y Bardasano (2000).

Se conoce que la activación de la enzima ATPasa propicia el buen funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , para garantizar la concentración adecuada de iones sodio extracelular que permita la entrada de glucosa a las células por el transporte activo secundario. Esto concuerda con el hecho de que la incorporación de glucosa al tejido epitelial (intestino), y los productos de digestión de proteínas como resultado de su catabolismo son absorbidos a nivel del duodeno y yeyuno gracias al transporte activo secundario, dependiente en todos los casos del gradiente de iones sodio creado gracias a la acción continuada de la enzima ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , para que funcione la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y a su vez se produzca la salida del ión calcio en el mecanismo de bombeo (Pallares, 1992; Azanza y Del Moral, 1994; Lozano y col., 1997).

Lo antes mencionado puede sugerir el papel del ion calcio en estos procesos metabólicos probablemente estimulado por acción de la Solución CM-95 TM. Se ha demostrado que la acción del campo magnético tiene impacto sobre la membrana biológica y favorece la rapidez de liberación del ión calcio (Azanza y Del Moral, 1994; Bardasano, 2000) o también altera el flujo de este ion en las células. También, Pessina (2001) reportó este fenómeno para campos magnéticos pulsantes de frecuencia extremadamente baja. Se conoce, que el calcio como mensajero secundario es un mediador del metabolismo celular y específicamente del transporte de iones, metabolismo de proteínas, transporte de glucosa, división, proliferación y reproducción celular, entre otros efectos (Polk y col., 1986; Azanza y col., 1994, Sciorsi, 2000).

### *3.1.2 Parámetros bioquímicos y hematológicos*

Los parámetros bioquímicos medidos en el suero sanguíneo de ratones Balb/c para los grupos experimentales GTM4, GSTM y GCN se muestran en la tabla 3.1

Esta tabla revela un incremento significativo de los iones sodio y calcio en el GTM4, con respecto al GSTM y GCN ( $P < 0,05$ ), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos controles para estos iones. En el GTM4 se registró una disminución significativa en la concentración del ion potasio, glucosa y proteínas totales, en comparación con los del GSTM y GCN. En el caso del ion potasio y de las proteínas totales no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos ( $P < 0,05$ ).

Tabla 3.1 Valores bioquímicos (Media  $\pm$  S) en las variables analizadas de ratones Balb/c tratados con CM-95 TM

<i>Variables</i>	<i>GTM4</i>	<i>GSTM</i>	<i>GCN</i>
Sodio (nmol/L)	148,0 $\pm$ 1,6 a	135,6 $\pm$ 3,2 b	139,3 $\pm$ 2,5 b
Potasio (nmol/L)	4,9 $\pm$ 0,2 b	5,4 $\pm$ 0,3 a	5,6 $\pm$ 0,3 a
Calcio (nmol/L)	4,1 $\pm$ 0,2 a	3,3 $\pm$ 0,1 b	3,2 $\pm$ 0,1 b
Glucosa ( nmol/L)	6,2 $\pm$ 0,4 c	7,5 $\pm$ 0,4 b	10,0 $\pm$ 0,2 a
Proteínas T (g/l)	49,3 $\pm$ 6,9 b	63,3 $\pm$ 5,7 a	65,3 $\pm$ 6,1 a

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* ( $P < 0,05$ ) obtenidas por Duncan.

La concentración de los iones sodio, potásio y calcio reportados en el GTM4, pudiera estar relacionada con la activación de la enzima ATPasa y los efectos del ion calcio antes mencionado. Cohincientemente Stange (2002) reportó un aumento del movimiento de estos iones hacia el exterior de las células cuando se aplicó un CME. Presuponemos que la glucosa, se incorporó más rápido a las células por requerimientos del metabolismo celular, y los aminoácidos podrían movilizarse para otras rutas metabólicas diferentes a la de las proteínas extracelulares, lo que probablemente hizo disminuir su concentración en el suero sanguíneo.

En la tabla 3.2 se muestran los valores de los parámetros hematológicos para los grupos experimentales GTM4, GSTM y GCN. En estos valores no se registraron diferencias significativas en el GTM4 en la concentración de hemoglobina (Hb) y hematocritos (Hto), con respecto al GSTM y GCN, ni entre estos dos grupos para estas variables. Se observó para el GTM4, un incremento significativo en el número total de leucocitos y de los linfocitos, en el conteo diferencial, en comparación a los del GSTM y GCN ( $P < 0,05$ ), mientras que hubo una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de los

polimorfonucleares (PMN) y monocitos en el grupo GTM4 con respecto a los controles. No hubo diferencias significativas entre el GSTM y GCN.

Cuando los animales se trataron con CM-95 TM (GTM4), se observó un aumento significativo del número total de leucocitos, lo que puede estar relacionado con el aumento en el número de linfocitos obtenido en este grupo, mientras que la disminución de los monocitos puede ser debido a su transformación a macrófagos, células que son funcionalmente importantes para la respuesta inmune. Estos resultados concuerdan con los reportados por Bermothly (1963) y Bacttolectty (1981), quienes demostraron que el campo magnético estático puede modificar el conteo de leucocitos sanguíneos.

Tabla 3.2 Valores hematológicos (Media  $\pm$  S) en las variables analizadas de ratones Balb/c tratados con CM-95 TM

VARIABLES	GTM4	GSTM	GCN
Hb (g/100mL)	11,0 $\pm$ 1,5	11,4 $\pm$ 1,0	11,5 $\pm$ 1,8
Hto (%)	43,0 $\pm$ 4,0	43,0 $\pm$ 3,5	45,0 $\pm$ 3,0
Leucocitos (10 <sup>9</sup> cel/L)	9,1 $\pm$ 0,4 a	8,1 $\pm$ 0,2 b	8,0 $\pm$ 0,3 b
Monocitos (%)	1,7 $\pm$ 0,4 b	3,5 $\pm$ 0,4 a	3,6 $\pm$ 0,2 a
Linfocitos (%)	86,0 $\pm$ 1,4 a	72,2 $\pm$ 2,3 b	71,2 $\pm$ 1,8 b
Polimorfonucleares (%)	12,4 $\pm$ 1,3 b	24,6 $\pm$ 1,7 a	24,8 $\pm$ 1,2 a

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* (P < 0,05) obtenidas por Duncan.

A pesar de las variaciones inducidas por CM-95 TM en la hematología sanguínea, los valores de Hb y Hto fueron similares entre los grupos y se mantuvieron dentro de los parámetros normales para la especie, al igual, que en el resto de los parámetros analizados (IFFA CREDO, 1999).

Los bioefectos producidos por la Solución CM-95 TM con respecto a la no tratada magnéticamente, pudieran ser explicados por los cambios de las cargas eléctricas a nivel de membrana celular, probablemente debido a cambios conformacionales y funcionales reversibles en las células, resultado acorde a lo citado por Fernández (1988). Estos cambios son dependientes de la inducción magnética, gradiente y tiempo de exposición del CME, así como del tipo de célula.

### 3.2 Respuesta Inmune humoral.

#### 3.2.1 Dinámica del título de anticuerpos por vía I.P. en ratones Balb/c.

En la figura 3.2 se muestran los resultados obtenidos en el título de anticuerpos para diferentes tiempos durante el esquema de inmunización desarrollado en ratones Balb/c, inoculados por vía I.P con un antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus* junto a CM-95 TM en los grupos de tratamiento GTM1, GTM2, GTM3 y GTM4, así como, en los controles GSTM, (CM-95 STM), GCP (antígeno en NaCl 0,9 %), GCP1 (hidróxido de aluminio) y el GCP2 (AFC y AFI).

En la respuesta primaria a los 7 días los mayores títulos de anticuerpos se obtuvieron para el GCP2 y GCP1, quienes presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con los grupos tratados GTM4, GTM2, GTM3 y GTM1, pero todos estos grupos tuvieron diferencias significativas con respecto al resto de los controles (GSTM y GCN)  $P < 0,05$ . También se observaron diferencias significativas de GTM4, GTM2 y GTM3 con respecto a GTM1 ( $P < 0,05$ ), y fue más acentuado para el GTM4.

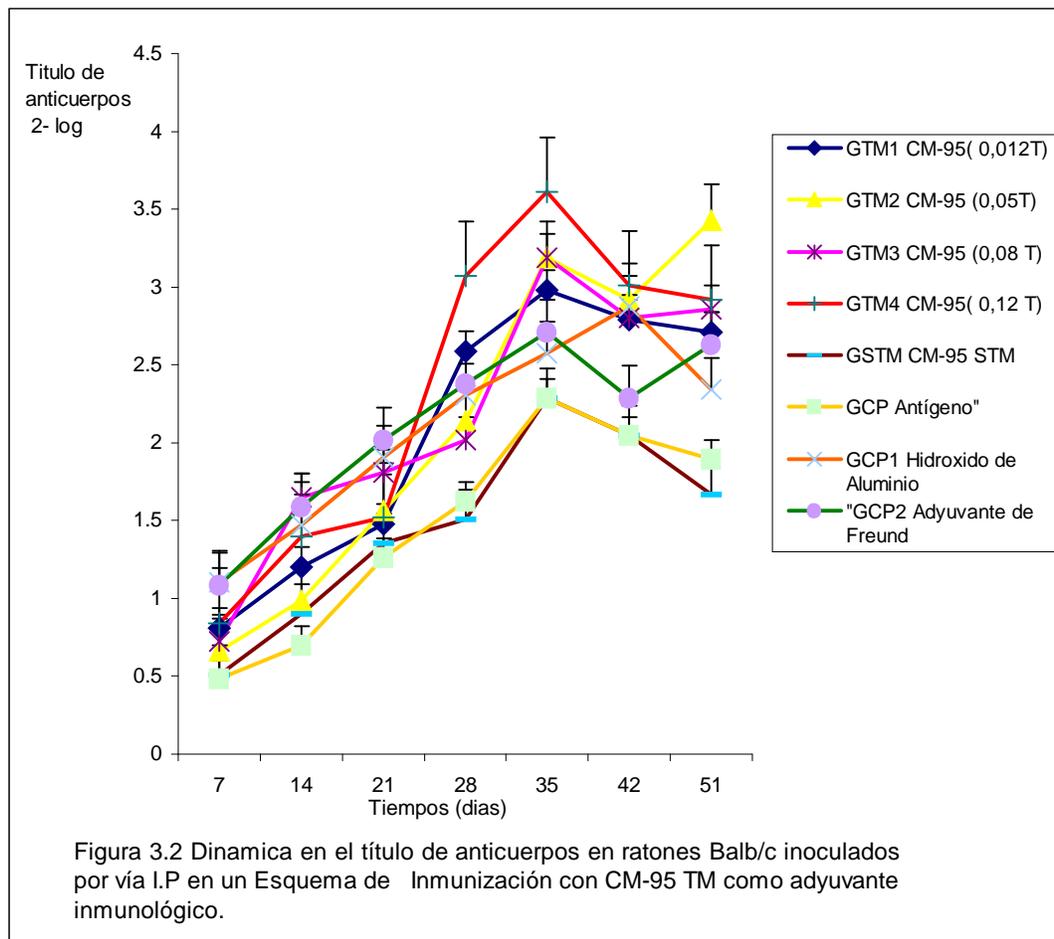
En la respuesta secundaria todos los grupos aumentaron el título de anticuerpos y mantuvieron un comportamiento ascendente en los días 14, 21, 28 y 35. A partir del día 28 los grupos GTM4 y GTM1 mostraron títulos significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) comparados con los de los grupos con adyuvantes convencionales (GCP2 y GCP) y con los tratados (GTM2 y GTM3), pero todos estos grupos tuvieron diferencias significativas en relación con GSTM y GCN

A los 35 días del esquema de inmunización se registraron los mayores valores de títulos de anticuerpos en casi todos los grupos, lo que se evidenció más para el GTM4, luego para el GTM3 y por último para el GTM2. Estos tres grupos tratados mostraron diferencias significativas con respecto a GTM1 y todos ellos en relación con los grupos controles ( $P < 0,05$ ).

A los 42 días todos los grupos disminuyeron su título de anticuerpos pero el GTM4 exhibió los mayores valores de títulos con respecto a GTM3, GTM2 y GTM1, siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Todos los grupos tratados mostraron un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de sus valores respecto a los de los controles. De los grupos controles, el GCP2 mostró diferencias significativas con el resto ( $P < 0,05$ ).

Al concluir el esquema de inmunización (a los 51 días) los grupos GTM2, GTM4, GTM3 y GTM1 tuvieron significativamente los títulos más elevados de anticuerpos,

con respecto a los de los grupos controles. Entre los controles, sólo en GCP2 y GCP1 (adyuvantes convencionales) las diferencias fueron significativas con respecto a los otros controles (GSTM y GCP). Entre estos dos últimos grupos no hubo diferencias significativas durante todo el esquema de inmunización.



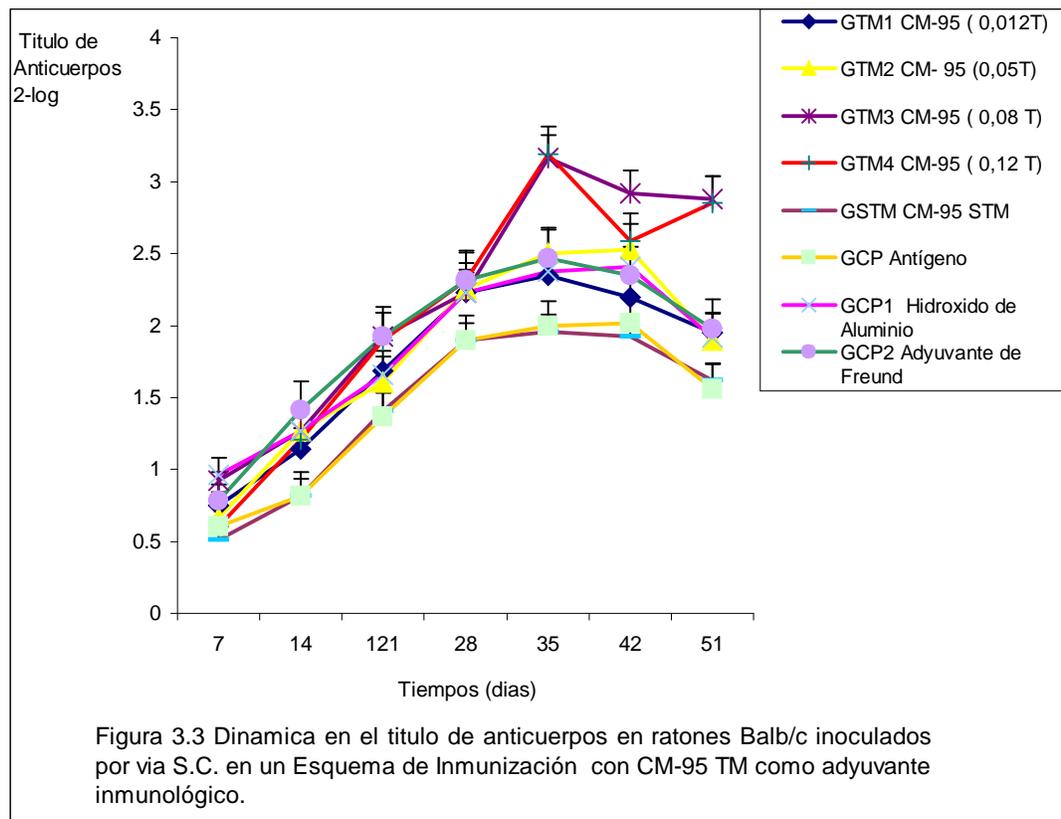
### 3.2.2 Dinámica del título de anticuerpos por vía S.C. en ratones Balb/c.

Los resultados obtenidos en la dinámica del título de anticuerpos durante el esquema de inmunización por vía S.C. en ratones Balb/c, se muestran en la figura 3.3 con antígenos de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* inoculados junto a CM-95 TM. Los grupos experimentales fueron los mismos que para el esquema I.P.

A los 7 días el GCP1 presentó los valores más elevados en el título de anticuerpos, con diferencias significativas del resto, luego se situaron el GTM1 y GCP2 y tuvieron

valores similares y los grupos GTM4 y GTM2, todos ellos se diferenciaron significativamente de los controles GCP y GSTM ( $P < 0,05$ ).

En la respuesta secundaria, a partir de los 14 días hubo un aumento en el título de anticuerpos para todos los grupos. Se situó por encima el control GCP2 (adyuvante de Freund), con diferencias significativas con el resto, luego el GTM2 con valores superiores a los demás tratados (GTM3, GTM1 y GTM4). Todos estos grupos presentaron diferencias significativas con los controles GCP y GSTM ( $P < 0,05$ ).



De la misma forma, a los 21 días, el GCP2 mantuvo los mayores títulos de anticuerpos, pero cercanos a este se situaron, los de GTM3 y GTM4, que mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto a GTM2, GTM1 y GCP1 y, a su vez, todos estos grupos con GCP y GSTM. El día 35 fue el tiempo donde se registraron los mayores títulos de anticuerpos, y fueron mayores para los grupos tratados al compararlos con los controles con adyuvantes convencionales (GCP1 y GCP2), mientras que GTM1 mantuvo valores por debajo de todos ellos. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

entre los grupos GTM4, GTM3, GTM2 y GCP2 en relación con GTM1 y al resto de los controles (GCP1, GCP y GSTM).

A los 42 días todos los grupos disminuyeron sus títulos de anticuerpos con un comportamiento similar entre ellos. A los 51 días los mejores títulos de anticuerpos se registraron en GTM3 y GTM4 comparados con GTM2, GCP2, GTM1, GCP1, GCP y GSTM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) fueron de GTM4 y GTM3 en relación con el resto de los grupos y de GCP2 y GCP1 con respecto a GCP y GSTM.

### 3.2.3 Dinámica del título de anticuerpos por vía I.V. en ratones Balb/c

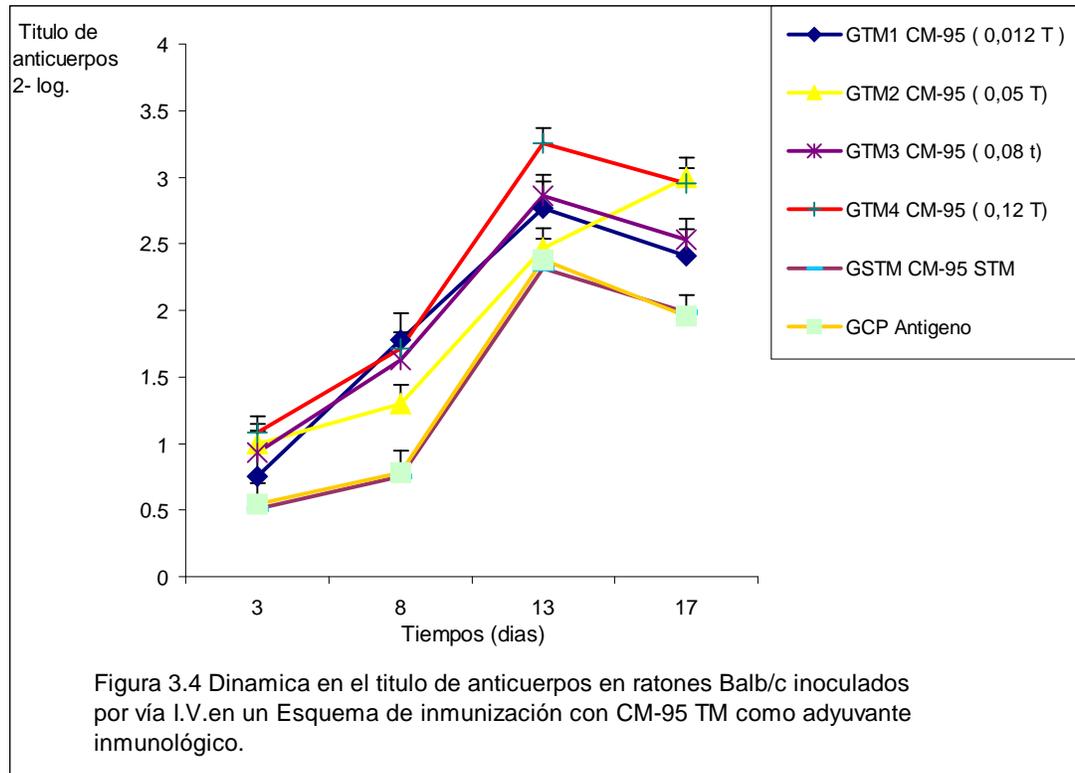
La figura 3.4 muestra la dinámica en la producción de anticuerpos (títulos) para el antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus*, inoculado junto a CM-95 TM por vía I.V. en ratones Balb/c, en seis grupos experimentales: GTM1, GTM2, GTM3 y GTM4 (con CM-95 TM) y los controles GCP (antígeno en NaCl 0,9 %) y GSTM (CM-95 STM).

A los 3 días de haberse iniciado el esquema de inmunización, los grupos GTM4, GTM2 y GTM3 exhibieron valores en el título de anticuerpos significativamente superiores en comparación con el resto de los grupos ( $P < 0,05$ ). Solo el GTM1 presentó valores similares a los controles, sin diferencias estadísticas con ellos. A los 8 días, cuando ya se habían realizado tres inoculaciones, el GTM1 elevó su título de anticuerpos y presentó valores significativamente superiores al resto de los grupos. Los grupos GTM3 y GTM4 mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con el GTM2 y todos ellos con respecto a los controles (GSTM y GCN).

A los 13 días fue el mejor tiempo donde todos los grupos incrementaron sus títulos de anticuerpos, y fue más significativo para el GTM4 y luego para el GTM3 GTM1 y GTM2. Las diferencias fueron entre el GTM4 y el resto de los grupos y del GTM3 en relación con el GTM1, y GTM2. EL GTM2 fue el único que no las tuvo con respecto a los controles.

Al finalizar el esquema de inmunización todos los grupos disminuyeron el título de anticuerpos (17 días), excepto el GTM2 quien lo aumentó, pero de todos, el GTM4 concluyó con los mayores títulos e anticuerpos, luego se situaron el GTM3, GTM2 y

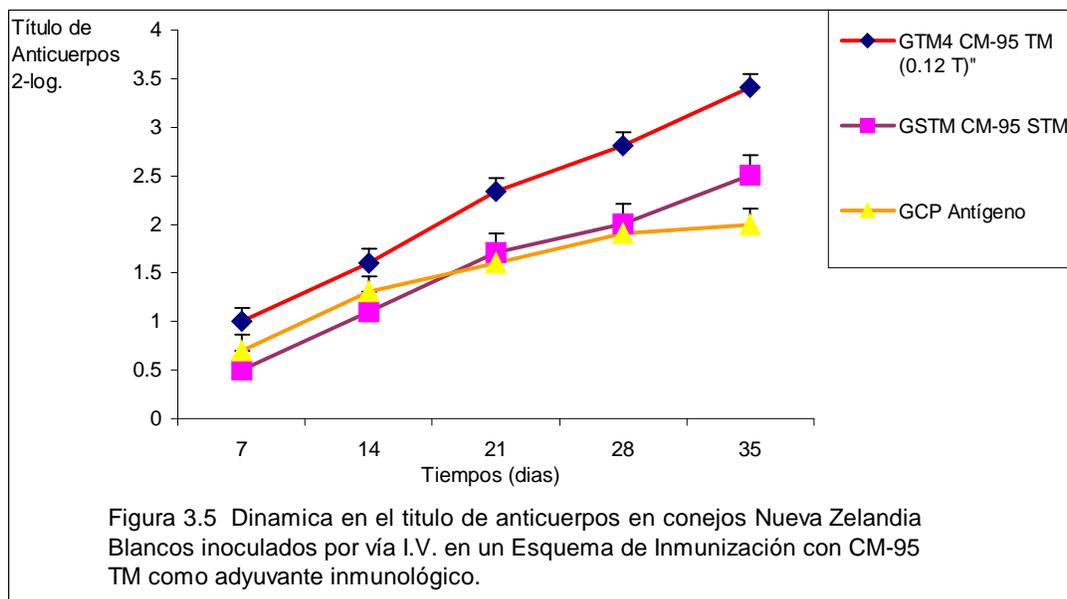
GTM1, las diferencias significativas fueron entre el GTM4 en relación con los grupos GTM3, GTM2, y GTM1 y todos con los controles GCP y GSTM ( $P < 0,05$ ).



### 3.2.4 Dinámica del título de anticuerpos por vía I.V. en Conejos NZB.

En la figura 3.5 se exponen los resultados en la dinámica del título de anticuerpos, para cada grupo experimental (GTM4, GSTM y CCP) en el esquema de inmunización de 35 días de duración, al utilizar el antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus*.

El título de anticuerpos se evaluó a los 7; 14; 21; 18 y 35 días durante el esquema de inmunización y se obtuvo que el GTM4, en todos los tiempos, mostró los mejores títulos junto con los de GSTM y GCP; sin embargo, a los 7 y 14 días no se observaron diferencias significativas entre GTM4 y GCP ( $P > 0,05$ ).



En la respuesta humoral, la dinámica en el título de anticuerpos obtenida al desarrollar los esquemas de inmunización por las vías I.P, S.C. e I.V. en ratones Balb/c como en conejos NZB por vía I.V, mostraron resultados satisfactorios para todos los grupos donde se utilizó CM-95 TM en las diferentes condiciones de tratamiento magnético aplicadas (GTM1, GTM2, GTM3, GTM4).

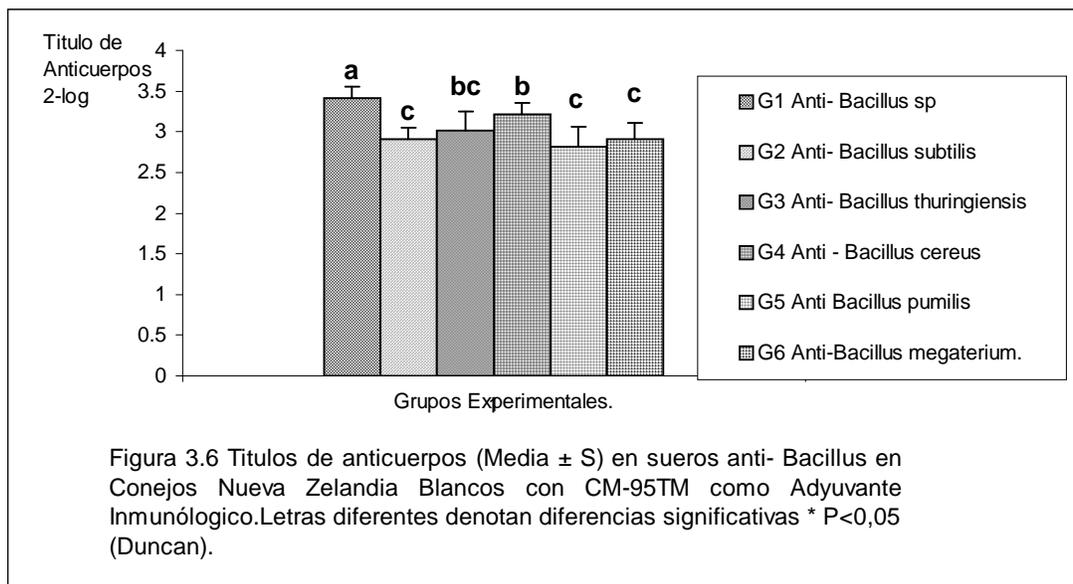
De todos ellos el GTM1 fue el que demostró tener menos efecto sobre la producción de anticuerpos (al ser inoculados los antígenos bacterianos), lo que pudo estar relacionado con la dosis mas baja de inducción magnética aplicada a CM-95 dentro del rango escogido.

La respuesta secundaria como era de esperar, reforzó los mecanismos fisiológicos de la reactividad inmunológica, con el consiguiente aumento de los anticuerpos circulantes (Roitt, 1998; Klein y col., 1997; Abbas y col., 2000), demostrado en todos los esquemas de inmunización desarrollados. Los grupos de tratamiento con CM-95 TM elevaron su título de anticuerpos a valores muy cercanos a los grupos donde se utilizaron adyuvantes convencionales (Adyuvante de Freund e hidróxido de aluminio), durante los primeros tiempos de la respuesta secundaria (vía I.P. y S.C.), pero luego superaron estos grupos hasta el final de lo esquemas de inmunización (figuras 3.2 y 3.3).

En las figuras 3.4 y 3.5 se muestran los esquemas de inmunización por vía I.V. para ratones y conejos, respectivamente. Estas figuras revelan que el comportamiento de los títulos de anticuerpos también fue significativamente superior para los grupos tratados. Los grupos controles donde se inoculó CM-95 STM o NaCl 0,9 % junto al antígeno, registraron los menores títulos de anticuerpos en todos los esquemas empleadas. Gupta (1996) resaltó las ventajas en el uso de adyuvantes inmunológicos para el desarrollo de una temprana, larga y duradera inmunidad, lograda fundamentalmente después de la respuesta primaria, lo que puede explicar los resultados obtenidos para los distintos grupos experimentales. Los resultados obtenidos el día 35 en los esquemas desarrollados por las vías I.P. y S.C. y el día 13 para el esquema I.V., con los mayores valores en el título de anticuerpos en los grupos de tratamiento (CM-95 TM), dan la posibilidad de un acortamiento en dichos esquemas a estos tiempos, de esta forma se ahorraría tiempo y se podría alcanzar una mayor eficacia y ahorro económico.

3.2.5 Titulo de anticuerpos en sueros policlonales anti-Bacillus.

En la figura 3.6 se muestran los resultados obtenidos con el uso de la Solución CM-95 TM como adyuvante inmunológico (GTM4), en la obtención de seis sueros policlonales para las bacterias del género Bacillus: (G1) anti-*Bacillus sp*), (G2) anti *Bacillus subtilis*, (G3) anti *Bacillus thuringiensis*, (G4) anti-*Bacillus cereus*, (G5) anti-*Bacillus pumilis*, (G6) anti- *Bacillus megaterium*.



El título de anticuerpos obtenido al finalizar estos esquemas de inmunización fue superior para el G1 y similar entre los grupos G3 y G4 pero todos ellos con diferencias significativas en relación con los grupos G2, G6 y G5 ( $P < 0,05$ ). Se demostró que la Solución CM-95 TM puede ser utilizada como adyuvante inmunológico por vía endovenosa, así lo expresan los resultados obtenidos en el título de anticuerpos que registraron los sueros anti-Bacillus, resultados reproducibles con el título registrado en el esquema desarrollado en conejos para el antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus*. Contradictoriamente los adyuvantes inmunológicos mas eficaces, comúnmente utilizados (hidróxido de aluminio y Adyuvante de Freund), producen obstrucción en las venas, quienes en sus mecanismos de acción tienen efecto de depósito, y provocan la formación de granulomas en el sitio de la inyección (Glenin, 1981; Gupta, 1996). Se ha demostrado que la Solución CM-95 TM al ser una sustancia soluble, no origina granulomas, lo que sugiere otro mecanismo de acción en su proceso de estimulación inmunológica.

### 3.2.6 Isotipos de anticuerpos.

La clase y subclases de anticuerpos registrados al concluir el esquema de inmunización por vía I.P. en ratones Balb/c, inoculados con el antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus* para el GTM4 (CM-95 TM), GSTM (CM- 95 STM), GCP (antígeno), GCP1 (hidróxido de aluminio) y GCP2 (Adyuvante de Freund), se muestran en la figura 3.7 como se observa, el GTM4 fue, de todos los grupos, el que mayor concentración de anticuerpos de la clase IgG registró, luego se situaron los grupos GCP2 y GCP1 (adyuvantes convencionales) y por último el GSTM y GCP. El GTM4 presentó diferencias significativas en relación con el resto y el GCP2 también con todos los que se situaron por debajo de el (GSTM, CCP, CCP1), mientras que, el GCP1 solo las presentó con respecto a los controles GCP y GSTM y este último con el GCP ( $P < 0,05$ ).

En el suero de los ratones Balb/c también se registró la presencia de las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG2a. Para la IgG1, el GTM4 se situó por encima de todos los grupos, mientras que para la IgG2a tuvo un comportamiento similar al GCP2 (Adyuvante de Freund), ambos con valores superiores al resto de los grupos, hubo

diferencias significativas con respecto a ellos, así como, entre el GCP y los controles GSTM y GCP1 ( $P < 0,05$ ). Solo el GSTM para la subclase IgG1 presentó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con el GCP1.

La eficacia de un adyuvante inmunológico está siendo juzgada por el isotipo de anticuerpo que induce en su respuesta. Los anticuerpos murinos de la clase IgG y las subclases IgG1 e IgG2a entre otras, esclarecen en parte el patrón de respuesta preferencial que puede inducir una sustancia inmunoestimulante (Graeme y col., 1990; Klein y col., 1997; Abbas y col., 2000, Casalinuovo y col., 2000). La literatura ha reportado que las esferas biodegradables así como el Adyuvante de Freund tienen un patrón de respuesta Th1/Th2 al registrarse la inducción de las subclases IgG1 e IgG2a en ratones Balb/c (Men y col., 1995), resultados similares se obtuvieron en este trabajo para CM-95 TM.

La Solución CM-95 TM como adyuvante inmunológico o inmunopotenciador cumple con uno de los requisitos para la selección de estas sustancias, al estimular la respuesta inmune humoral con la producción de anticuerpos de la clase IgG, los que pueden ser de alta afinidad y participar en la defensa del organismo de forma efectiva (subclase IgG2a), propios de una respuesta secundaria, donde ya existe una memoria inmunológica. Como se ha demostrado, la Solución en estudio tiene un comportamiento similar o superior a los adyuvantes convencionales evaluados, en la estimulación de anticuerpos de la clase IgG. Tum (1988); Klein y col. (1997), Abbas y col. (2000) reportaron la importancia de los adyuvante inmunológicos en la modulación de la respuesta de anticuerpos.

Por estos resultados se infiere que CM-5 TM tiene una acción evidente sobre linfocitos B, al inducir su diferenciación para la producción de los anticuerpos antibacterianos, con la intervención de otras células, como los linfocitos CD4<sup>+</sup> cooperadores, restringidos por moléculas MHC clase II, las que debieron reconocer los fragmentos peptídico en células presentadoras de antígenos (CPA) (macrófagos o linfocitos B entre otras) y la participación de citocinas como mediadores solubles en los procesos de activación y diferenciación celular.

Por otro lado, la presencia de anticuerpos de la subclase IgG1, demostró la posibilidad que tiene la Solución CM-95 TM de inducir una respuesta humoral mediada por

linfocitos TCD4<sup>+</sup> Th2. Mientras tanto, la presencia de la subclase IgG2a también en ratones, indica la intervención de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1, que por la liberación del INF $\gamma$ , pudieron inducir al *swictching* de clase en las cadenas pesadas para producir este isotipo de anticuerpo, o estimular la expresión de moléculas MHC clase II en macrófagos y amplificar la presentación de los antígenos, como señalan diferentes autores al describir los mecanismos de la inmunidad humoral (Klein y col., 1997; Abbas y col., 2000).

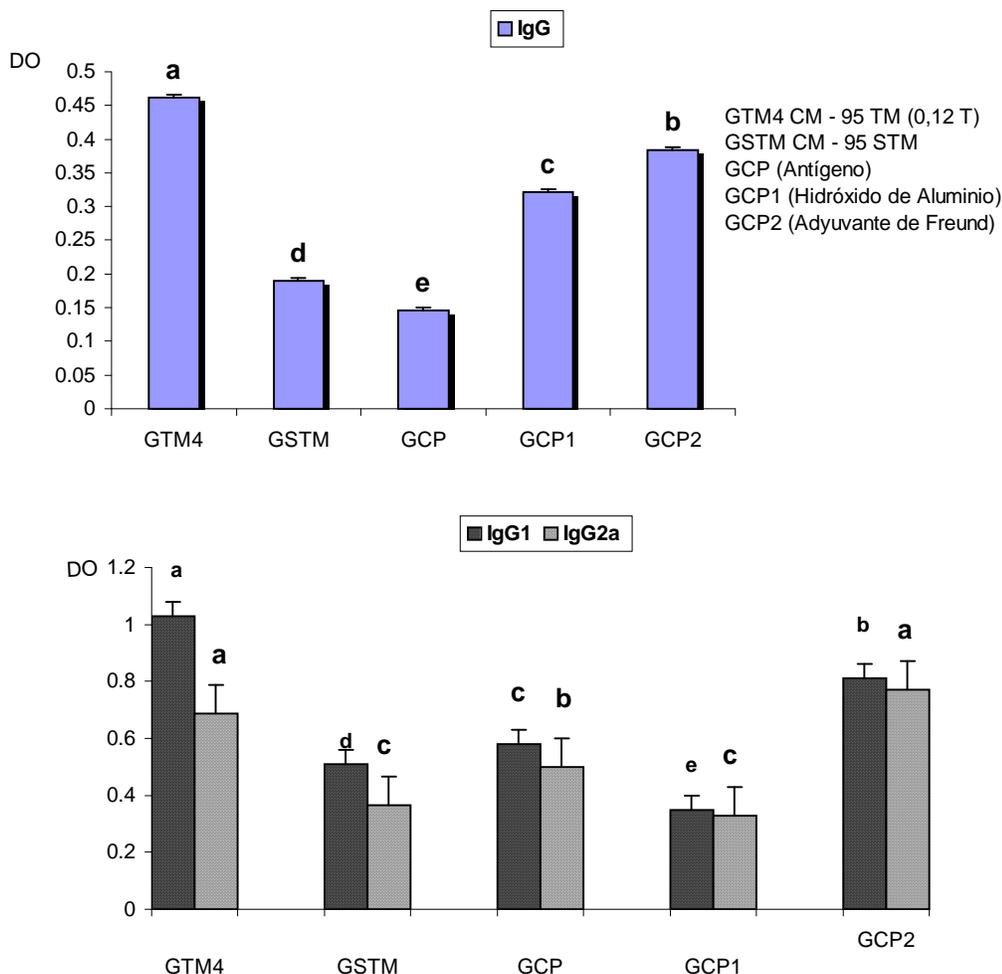
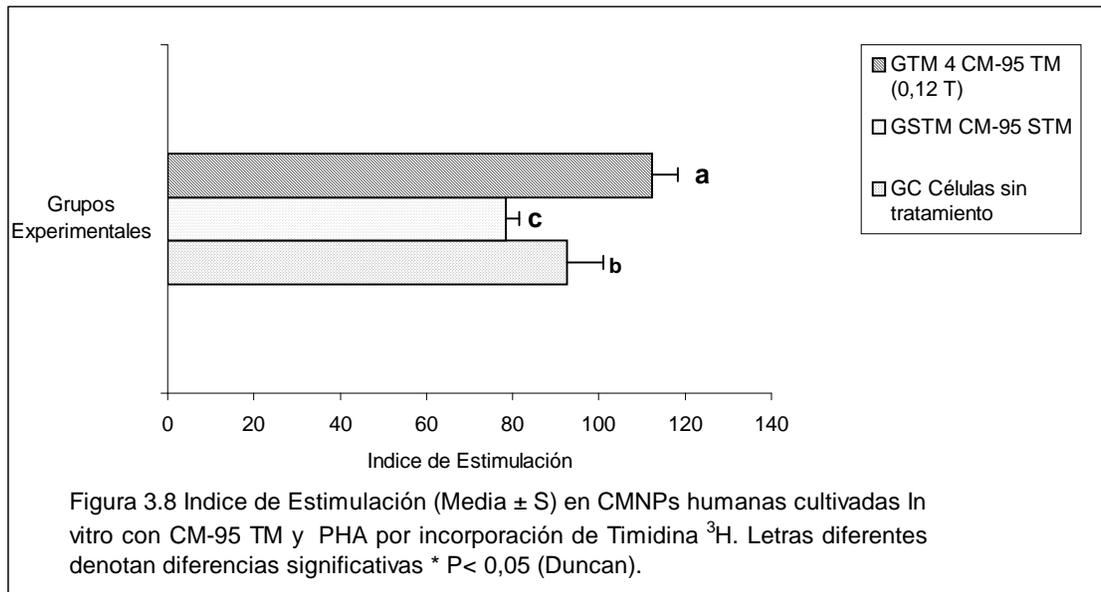


Figura 3.7 Isotipos de Anticuerpos (Media  $\pm$  S) en ratones Balb/c inoculados por vía I.P. en un Esquema de inmunización con CM-95 TM como Adyuvante Inmunológico. Letras diferentes denotan diferencias significativas \* P < 0,05. (Duncan).

### 3. 3 Respuesta Inmune mediada por células.

3.3.1 Índice de Estimulación en CMNPs humanas cultivadas *in vitro*

Los valores en el Índice de estimulación (IA) obtenido en las células mononucleares periféricas humanas (CMNPs) cultivadas *in vitro* con PHA 1:100 en los grupos GTM4 (CM-95 TM); GSTM (CM-95 STM) o GC (con PHA), se muestran en la figura 3.8.

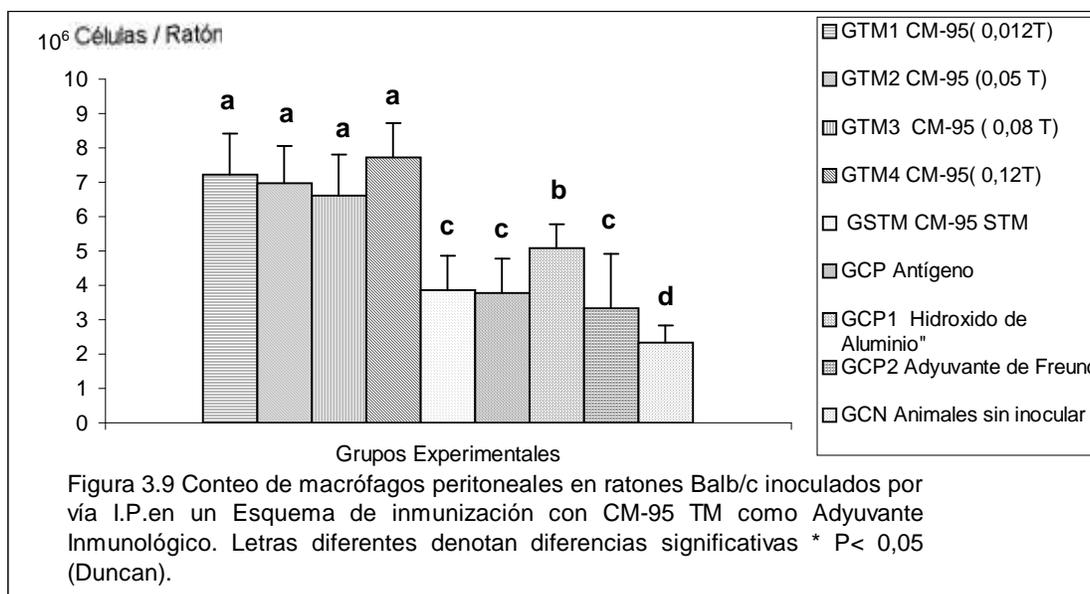


En este experimento los mejores valores en el IA se obtuvieron para el grupo GTM4, el que presentó diferencias significativas en relación con ambos controles (P< 0,05). Se registraron estas diferencias entre los controles, con los valores más bajos para el GSTM. Se conoce que la PHA es una lectina que a concentraciones óptimas tiene acción mitogénica sobre los leucocitos y específicamente sobre los linfocitos T (Klein y col., 1997), por lo que, con este ensayo se pudo verificar que la Solución CM-95 TM pudo potenciar la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humanas, las que tienen gran importancia en la inmunidad. Mevissen y col. (1998) reportaron la acción mitogénica de campos magnéticos de 50 Hz y 0,0001 T sobre linfocitos T cultivados *in vitro* con concavalina A.

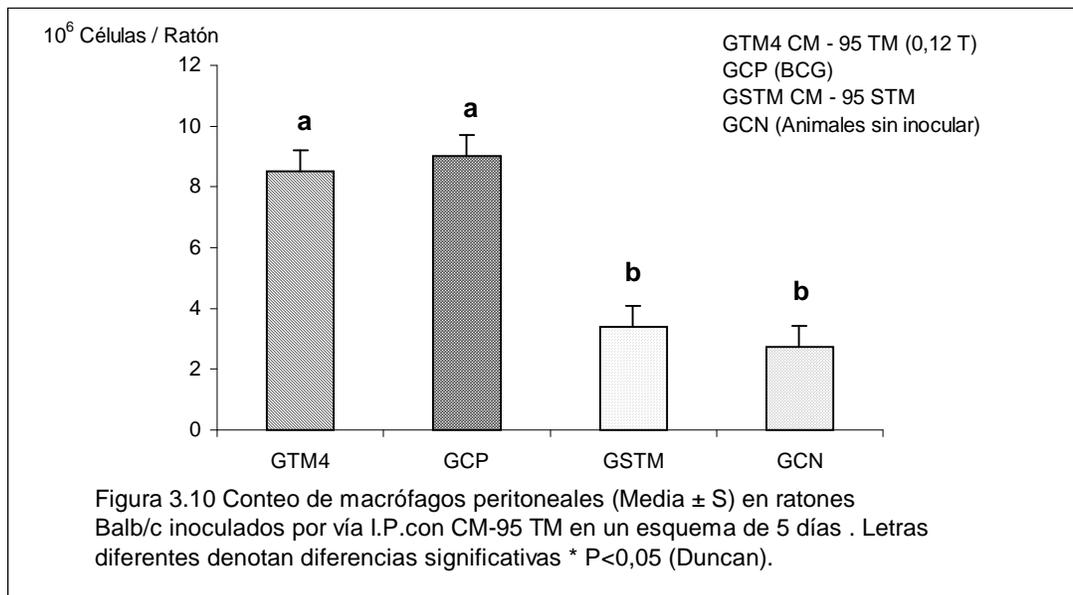
3.3.2 Conteo de macrófagos por exudado peritoneal.

Los resultados en el conteo de macrófagos peritoneales, al final del esquema de inmunización en ratone Balb/c inoculados por vía I.P., con la Solución CM-95 TM junto al antígeno somático de la bacteria *Bacillus cereus*, se exponen en la figura 3.9 y en las

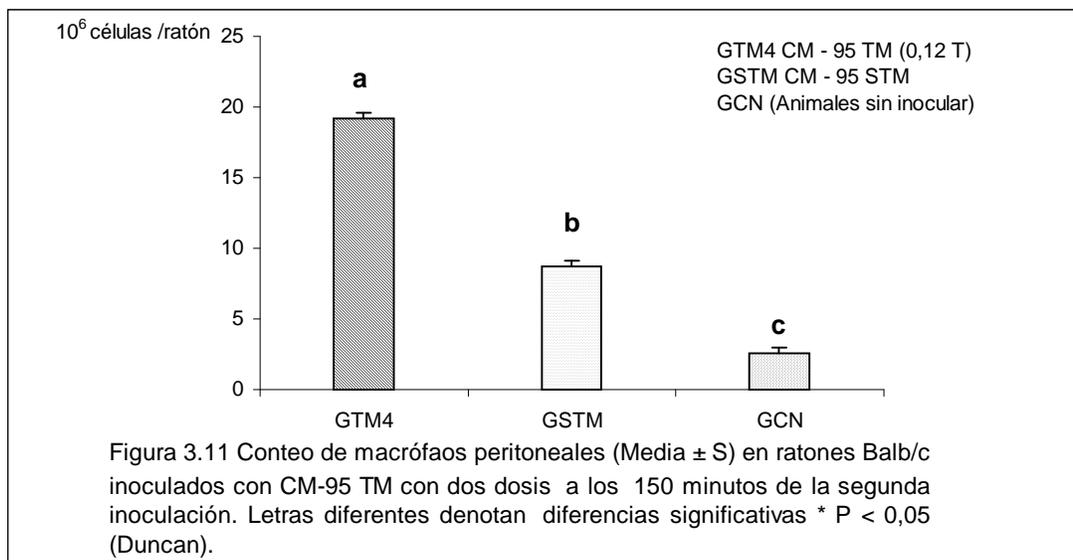
figuras 3.10 y 3.11, cuando se inoculó CM-95 TM sin antígeno utilizando la vía I.P. en un esquema de 5 días y tres inoculaciones y otro de dos inoculaciones respectivamente. La figura 3.9 registra en todos los grupos tratados (GTM1,GTM2, GTM3 y GTM4), valores superiores en el conteo de macrófagos peritoneales al resto de los grupos, incluidos los que utilizaron adyuvantes convencionales GCP1 (hidróxido de aluminio) y GCP2 (Adyuvante de Freund),con diferencias significativas con ellos ( $P < 0,05$ ). El GTM4 fue el de mejores resultados y tuvo diferencias significativas en relación con todos los grupos. Las diferencias significativas entre los controles fueron del GSTM, GCN y GCP2 con el GCN y del GCP1 con el resto de los controles ( $P < 0,05$ ).



Cuando se inoculó CM-95 TM sin antígeno, en el esquema de 5 días (3 inoculaciones), (figura 3.10), también se obtuvo buena respuesta en el conteo de macrófagos peritoneales para el grupo de tratamiento GTM4 en relación con los grupos controles GSTM y GCN. El GCP (BCG) se situó muy cerca del GTM4, siendo el que mayores resultados reportó, las diferencias significativas fueron de estos grupos con los controles GSTM y GCN ( $P < 0,05$ ), pero no entre ellos.



En el esquema de dos inoculaciones, el grupo de tratamiento GTM4 fue significativamente superior que el GSTM y GCN, pero también el GSTM presentó diferencias significativas con respecto al GCN ( $P < 0,05$ ), resultados mostrados en la figura 3.1.1.

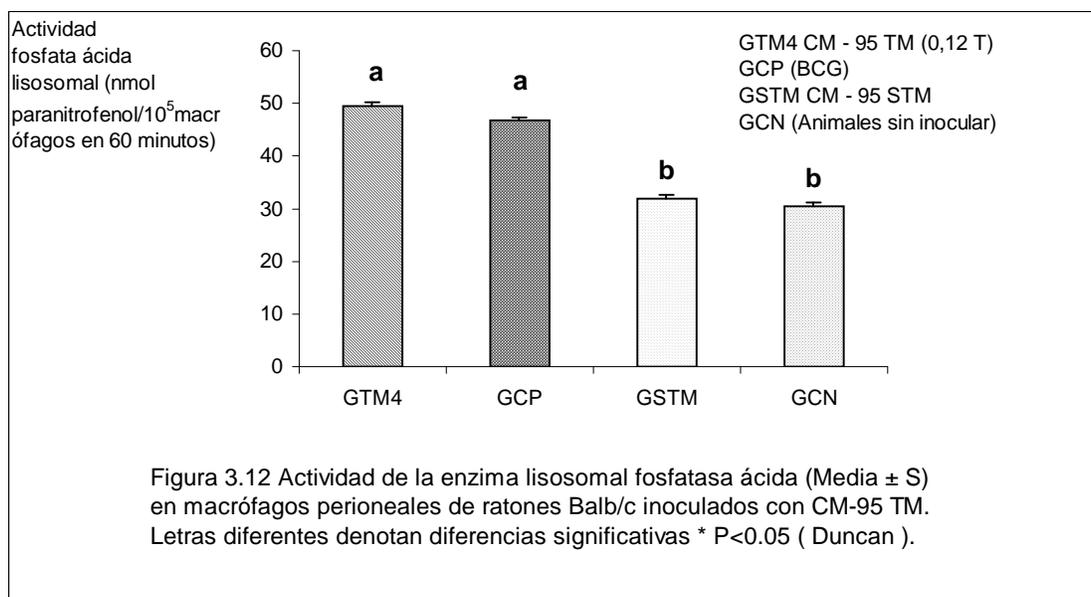


Aún cuando para ambos esquemas de inoculaciones se obtuvo buena respuesta para el grupo GTM4, la acción de CM-95TM logró aumentar en mayor medida el número de macrófagos peritoneales cuando fue inoculada en dos dosis. Se pudo demostrar que la Solución CM-95TM tuvo acción específica e inespecífica sobre los fagocitos

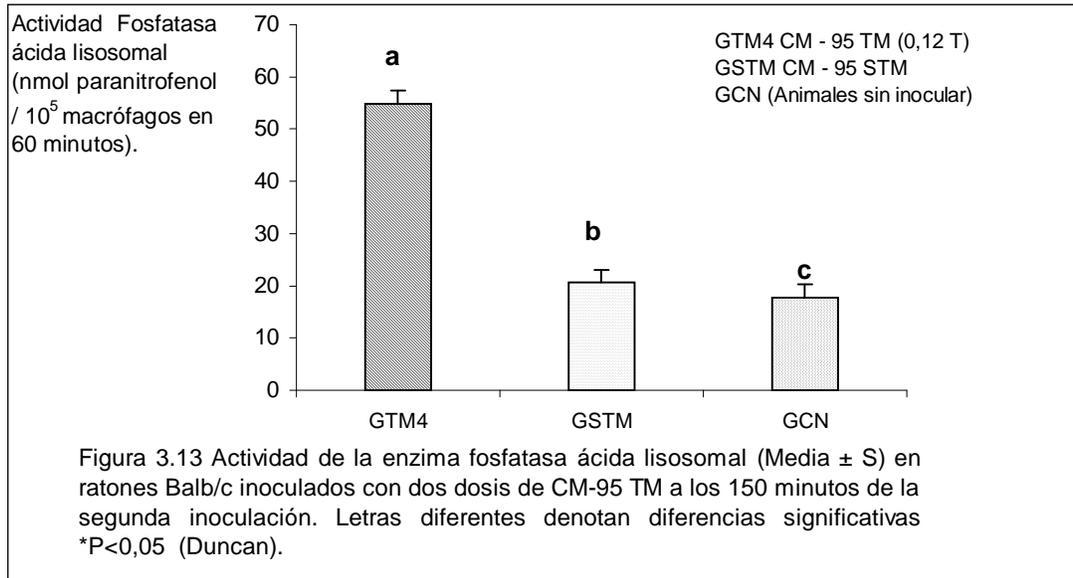
peritoneales, los que aumentaron en número al diferenciarse los monocitos sanguíneos o estimular a los macrófagos residentes en la serosa de la cavidad peritoneal, y movilizarse al peritoneo bajo la estimulación recibida (Kraasnow, 1991; Klein y col.,1997, Abbas y col., 2000). Podría defenderse la hipótesis de que CM-95 TM en las condiciones ensayadas actúa como un agente quimiotáctico o propicia esta acción. La literatura señala que una de las funciones de los adyuvantes inmunológicos es aumentar el reclutamiento de fagocitos mononucleares en los sitios de inmunización (Abbas y col., 2000).

3.3.3 Actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal.

En las figuras 3.12 y 3.13 se exponen los resultados sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal, en los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c, previamente inoculados con CM-95 TM en esquemas de inoculaciones de tres y dos inoculaciones, respectivamente. El grupo que recibió CM-95 TM (GTM4) y el control con BCG (GCP) representados en la figura 3.12, presentaron valores mucho mas elevados que los grupos que recibieron CM-95 STM (GSTM) o los animales sin inocular (GCN). Las diferencias significativas fueron entre los del GTM4 y del GCP con respecto a los controles GSTM y GCN ( $P < 0,05$ ).



La figura 3.13 destaca que la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal en el GTM4 fue superior a la obtenida para el esquema de tres inoculaciones, se mantuvieron las diferencias significativas con respecto a los grupos GSTM y GCN y entre los controles ( $P < 0,05$ ).



Estos resultados sugieren la activación del sistema complemento como parte del mecanismo de acción de CM-95 TM. Se ha demostrado que la enzima fosfatasa ácida lisosomal actúa sobre ésteres de compuestos con grupos fosfatos en su estructura, y ha sido referida la participación de la vía alternativa del complemento (C3b) en su activación (Jarmila y col., 1993). Además, ofrece la posibilidad de activar una enzima que en conjunto con el resto de las lisosomales en los macrófagos, propicia el segundo mecanismo fagocítico fundamental independiente del oxígeno como parte de los mecanismos inespecíficos de la defensa del organismo (Famboaim, 1996).

### 3.3.4 Fagocitosis.

La tabla 3.3 resume los valores medios en el índice fagocítico y por ciento de fagocitosis, obtenido por vía I.P. en ratones Balb/c para los grupos experimentales GTM4, GSTM y GCN.

El GTM4 donde se utilizó CM-95 TM indujo actividad fagocítica, reflejado en un mayor índice fagocítico y por ciento de fagocitosis (tabla 3.3), con diferencias significativas con respecto a los controles ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, el grupo donde se

utilizó CM-95 STM mostró un comportamiento muy similar al grupo GCN. Estos resultados evidencian, en general, la superioridad en la actividad de los fagocitos extraídos de los animales que fueron tratados con la Solución CM-95 TM. Estos resultados se corresponden con el comportamiento observado en la actividad de la fosfatasa ácida lisosomal, cuando se evaluó con este esquema de inoculaciones (figura 3.13), en función de una eliminación mas rápida del agente extraño, microorganismos en nuestro caso, o bien la posible eliminación de células tumorales (Jarmila,1993; Klein y col.,1997, Abbas y col., 2000).

Tabla 3.3 Fagocitosis en macrófagos peritoneales de ratones Balb/c inoculados por vía I.P. con la Solución CM-95 TM. (Media ± S).

Grupos	% de Fagocitosis	Indice fagocítico
GTM4	75,2 ± 3,7 a	1,64 ± 0,07 a
GSTM	51,8 ± 2,9 b	0,55 ± 0,08 b
GCN	48,0 ± 2,0 b	0,48 ± 0,09 b

Letras diferentes denotan diferencias significativas \* P < 0,05 (Duncan).

### 3.3.5. Hipersensibilidad retardada.

En la tabla 3.4 se exponen los valores promedios del edema producido y el porcentaje de incremento obtenido en el cojinete de la pata de ratones Balb/c, retados con BSA al 1 % a las 24; 48; y 72 horas para diferentes grupos experimentales.

Tabla 3.4 Reacción de HRT (Media ± S) por acción de CM-95 TM con BSA 1 % en ratones Balb/c.

Grupos	24 Horas		48 Horas		72 Horas	
	Grosor (mms)	% (incremento)	Grosor (mms)	% (incremento)	Grosor (mms)	% (incremento)
N =10						
CM-95 TM-BSA	0,050 ± 0,008 a	41,4	0,047 ± 0,007 a	38,5	0,036 ± 0,004 a	30,0
CM-95 TM	0,020 ± 0,004 b	16,4	0,018 ± 0,002 b	14,0	0,015 ± 0,003 b	12,3
CM-95 STM -BSA	0,023 ± 0,003 b	18,1	0,019 ± 0,005 b	15,6	0,016 ± 0,003 b	13,1
CM-95 STM	0,022 ± 0,004 b	18,0	0,020 ± 0,003 b	16,3	0,017 ± 0,002 b	13,9
NaCl -BSA	0,020 ± 0,005 b	16,3	0,019 ± 0,003 b	15,6	0,016 ± 0,003 b	13,4
NaCl	0,002 ± 0,005 b	16,4	0,019 ± 0,002 b	15,6	0,017 ± 0,002 b	12,2

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* (P < 0,05) obtenidas por Duncan.

En el grupo donde se inoculó la Solución CM-95 TM junto al antígeno (CM-95 TM - BSA) se obtuvieron resultados significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) en ambos parámetros; en relación con el resto de los grupos, donde se inoculó CM-95 TM sin antígeno, sin tratamiento magnético junto al antígeno o sin el, el antígeno BSA en NaCl 0,9 % o el NaCl 0,9 %. Entre estos grupos no se detectaron diferencias de significación estadística. Se observó que el grosor del edema formado en el cojinete de la pata izquierda de los ratones, dentro de un mismo grupo varió con el tiempo, fue mayor a las 24 horas, pero se mantuvo hasta las 72 horas.

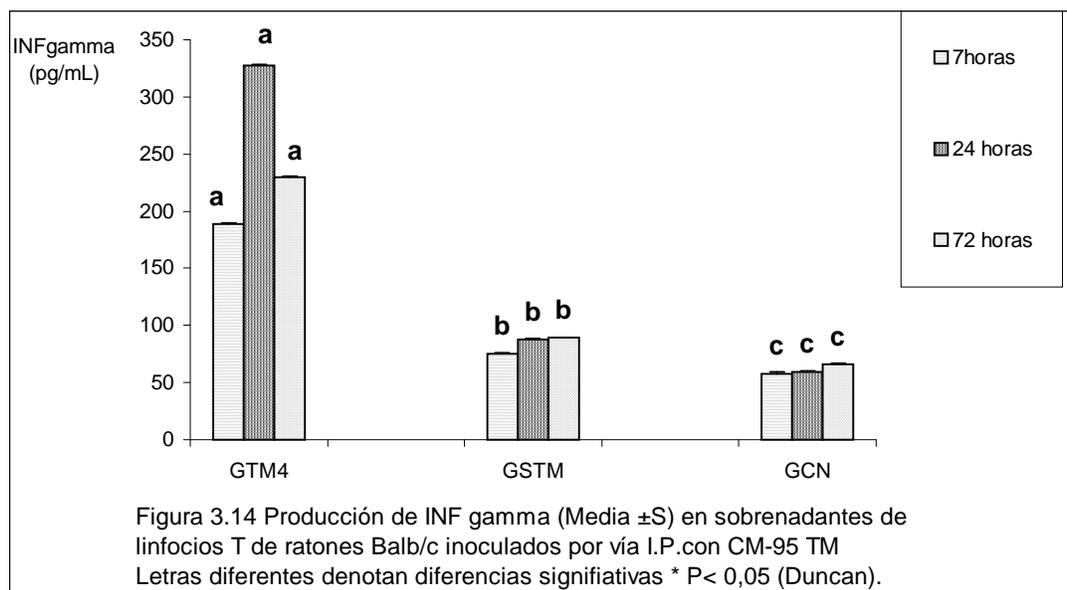
Estos resultados sugieren que la Solución CM-95 TM induce una respuesta inflamatoria local a la BSA, manifestándose la HRT por activación de linfocitos T ( $CD4^+$  Th1), cruciales también para la respuesta del organismo frente a numerosas enfermedades infecciosas cuando se trata de microorganismos intracelulares. (Thomas y col., 1998; Smith, 1996; Abbas y col., 2000; Lee y col., 2001). Esta activación es atribuida a la presencia de las citocinas como el  $INF\gamma$  y el  $TNF\alpha$ , quienes son potentes activadores de los macrófagos (Abbas y col., 2000).

### 3.3.6 Producción de citocinas

La figura 3.14 muestra la secreción de citocinas como  $INF\gamma$ , en sobrenadantes de linfocitos obtenidos de ratones Balb/c, inoculados por vía I.P. para los grupos GTM4, GSTM y GCN. Como se observa el GTM4 (CM-95 TM) duplicó la concentración de  $INF\gamma$  a las 7 y 72 horas de haberse concluido el esquema de inoculaciones y la triplicó a las 24 horas en relación con los grupos GSTM y GCN, resultados que fueron demostrados estadísticamente al presentar el GTM4 diferencias significativas con respecto al resto de los grupos en los tres tiempos evaluados, también el grupo GSTM mostró diferencias significativas en relación con el GCN ( $P < 0,05$ ). CM-95 TM (GTM4) no estimuló la secreción de IL-5 en las condiciones ensayadas, al igual que el resto de los grupos experimentales (GSTM y GCN).

Este comportamiento podría explicarse, por la acción supresora que ejerce el  $INF\gamma$  sobre las reacciones ricas en Th2 y específicamente sobre los clones productores de IL-5, lo que concuerda con Abbas y col. (2000).

Estos resultados demuestran que los linfocitos T pueden ser estimulados con CM-95 TM, lo que indicaría que su composición iónica favorece este efecto, además de la influencia del campo magnético aplicado. Es conocido que los receptores de linfocitos T pueden ser estimulados por sustancias de variada naturaleza, como enzimas proteolíticas, citoquinas, productos de síntesis química, e incluso iones, entre otras sustancias (Galile y col, 1994; Miku, 1994; Klein y col., 1997), así como por la acción del campo magnético (Bardasano, 2000).



Por otro lado, es evidente que la inducción del INF $\gamma$ , podría ser la vía más importante para que CM-95 TM estimule la respuesta inmune mediada por células, y favorezca el patrón de respuesta preferencial Th1, con la participación de linfocitos T (cooperadores CD4<sup>+</sup>). Esto podría argumentar los efectos ya discutidos sobre la activación de macrófagos peritoneales, la HRT y la obtención de isotipos de anticuerpos IgG2a en ratones Balb/c, por la función que tiene esta citoquina en estos procesos. (Abbas y col., 2000).

### 3.4. Toxicidad e Inmunotoxicidad

#### 3.4.1 Signos clínicos

Las ratas SPD sometidas al tratamiento con la Solución CM-95TM, en tres niveles de inducción magnética (Nivel I, II y III), con inoculaciones diarias durante 7 y 28 días por

vía I.P., presentaron un comportamiento normal en la evaluación diaria, manteniendo buena vitalidad, no se observaron signos clínicos de intoxicación, vómitos diarreas, pilo erección, cambios en la frecuencia respiratoria, ataxia, y no hubo muertes, por lo que, desde el punto de vista clínico el producto fue bien tolerado. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en las ratas normales, donde no se hizo ninguna inoculación (GCN), o en el grupo control GSTM (CM-95 STM); a su vez hubo buena tolerancia local y no se observaron alteraciones en el sitio de inoculación como si sucede con otros inmunopotenciadores (Graeme, 1990).

3.4.2 *Peso de los animales*

El peso de los animales obtenido durante los experimentos a los 7 y 28 días para machos y hembras respectivamente, se exponen en la figura 3.15 para los tres niveles de inducción magnética y los grupos controles GSTM y GCN.

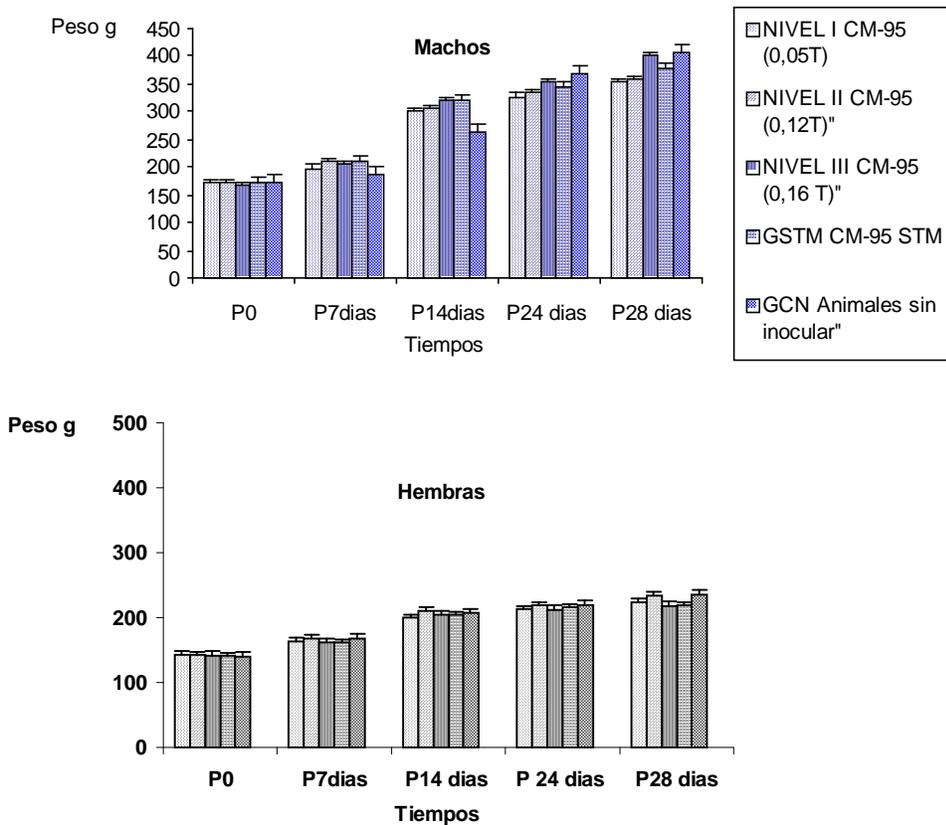


FIGURA 3.15 Ganacia del peso de los animales durante los experimentos

Los machos, a los 7 días, incrementaron su peso de forma ligera en todos los grupos que recibieron CM-95 TM (Niveles I; II; III), así como también en el GSTM en relación con el control GCN, sin diferencias de significación estadística. A los 28 días los mayores pesos se registraron para el Nivel III y el GCN. Hubo diferencias significativas de estos grupos con respecto a los Niveles I y II y al GSTM ( $P < 0,05$ ).

En el caso de las hembras, a los 7 días, el peso registrado para los diferentes grupos experimentales fue similar. A los 28 días los Niveles I, II y el GCN exhibieron un peso ligeramente superior. Se registraron diferencias significativas entre el Nivel II y el GCN con el Nivel III y el GSTM ( $P < 0,05$ ). Entre sexos, los machos tuvieron valores superiores a las hembras, y las diferencias fueron significativas con ellas en ambos tiempos. El incremento de peso de los animales durante los experimentos, estuvieron acordes con la edad y sexo registrados para las ratas SPD.

#### *3.4.3 Peso relativo del timo*

En la tabla 3.5 se muestran los resultados del peso relativo del timo para los machos y hembras a los 7 y 28 días de tratamiento, en los grupos experimentales. En los machos a estos tiempos se obtuvieron valores similares en los Niveles I, II y III, pero a los 7 días éstos dos últimos niveles tuvieron resultados algo superiores al resto, y a los 28 días este comportamiento lo tuvo el Nivel II. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos.

Las hembras tuvieron un comportamiento similar a los 7 días, no se registraron diferencias significativas entre los grupos. A los 28 días los tres niveles de tratamiento magnético presentaron diferencias significativas con el GCN ( $P < 0,05$ ). Entre sexos no hubo diferencias significativas a los 7 días pero si a los 28 días, cuando las hembras registraron valores superiores que los machos ( $P < 0,05$ ).

Tabla 3.5 Peso relativo del timo (Media ± S) en ratas Sprague-Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente.

Variantes	7 Días		28 Días	
	Machos ± S	Hembras ± S	Machos ± S	Hembras ± S
NIVEL I	0,0023 ± 0,0002	0,0024 ± 0,0004	0,0014 ± 0,0004	0,0023 ± 0,0002 a
NIVEL II	0,0027 ± 0,0004	0,0026 ± 0,0002	0,0016 ± 0,0002	0,0025 ± 0,0002 a
NIVELIII	0,0025 ± 0,0001	0,0023 ± 0,0002	0,0014 ± 0,0002	0,0023 ± 0,0003 a
GSTM	0,0026 ± 0,0003	0,0023 ± 0,0001	0,0013 ± 0,0002	0,0021 ± 0,0005 ab
GCN	0,0023 ± 0,0002	0,0023 ± 0,0003	0,0014 ± 0,0001	0,0018 ± 0,0002 b

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* (P < 0,05) obtenidas por Duncan.

#### 3.4.4 Peso relativo del bazo

Los valores en el peso relativo del bazo para los grupos experimentales, en machos y hembras a los 7 y 28 días de tratamiento, se muestran en la tabla 3.6. A los 7 días en los machos, el Nivel II fue algo superior al resto de los grupos pero no se presentaron diferencias estadísticas entre ellos, al igual que a los 28 días.

Las hembras reportaron los mayores valores a los 7 días en los Niveles II y III, el Nivel I se situó muy cerca de los controles. No se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos; solo las hembras a los 28 días mostraron diferencias significativas en los Niveles II y III con respecto al GCN, así como entre sexos a los 28 días (P < 0,05), se observaron en las hembras valores superiores en relación con los machos.

Tabla 3.6 Peso relativo del bazo (Media ± S) en ratas Sprague-Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente.

Variantes	7 Días		28 Días	
	n=10 Machos ± S	Hembras ± S	Machos ± S	Hembras ± S
NIVEL I	0,0023 ± 0,0003	0,0021 ± 0,0002	0,0017 ± 0,0001	0,0023 ± 0,0003 ab
NIVEL II	0,0024 ± 0,0001	0,0024 ± 0,0001	0,0018 ± 0,0001	0,0025 ± 0,0003 a
NIVELIII	0,0023 ± 0,0001	0,0023 ± 0,0001	0,0017 ± 0,0002	0,0024 ± 0,0002 a
GSTM	0,0023 ± 0,0003	0,0021 ± 0,0002	0,0019 ± 0,0001	0,0022 ± 0,0002 ab
GCN	0,0022 ± 0,0003	0,0022 ± 0,0001	0,0018 ± 0,0001	0,0020 ± 0,0001 b

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* (P < 0,05) obtenidas por Duncan.

Como se observa, en los pesos relativos de timo y bazo no hubo diferencias de importancia entre los grupos tratados y controles a los 7 y 28 días. Todo parece indicar que la Solución CM-95 TM no produjo procesos inflamatorios del tejido o signos de toxicidad que se tradujeran en un aumento significativo del peso de estos órganos, como sí ocurre con otros inmunopotenciadores como la BCG, la que induce aparición de procesos inflamatorios localizados (Klein y col., 1997).

#### *3.4.5 Celularidad de médula ósea*

La tabla 3.7 refiere los valores obtenidos en la celularidad de la médula ósea en ratas SPD, para machos y hembras durante 7 y 28 días de tratamiento, en los grupos experimentales (Niveles I, II, III) y los controles GSTM, GCN.

Los datos registrados en la tabla 3.7 indican que la celularidad de la médula ósea a los 7 días de tratamiento para ambos sexos, aumentó con el nivel de tratamiento magnético. El Nivel III se situó por encima de todos los grupos, luego en orden los niveles II y I, este último con valores muy cercanos al GSTM. Las diferencias significativas fueron del Nivel III con respecto al II y estos dos con el Nivel I y los controles, así como el GSTM y el GCN ( $P < 0,05$ ).

A los 28 días, ambos sexos aumentaron la celularidad de la médula ósea en todos los grupos, pero los valores más elevados fueron para el Nivel I, que presentó diferencias significativas con respecto al resto de los grupos. Además el nivel III se diferenció significativamente en comparación con el Nivel II y ambos respecto a GSTM y GCN. Entre estos dos grupos controles también se encontró diferencias significativas; al igual que entre machos y hembras a los 7 y 28 días ( $P < 0,05$ ).

Al evaluar la celularidad de la médula ósea, se está relacionando el efecto de la Solución CM-95 TM sobre la actividad hematopoyética de la misma (médula roja). Se pudo observar una tendencia al incremento celular en los grupos tratados (Niveles I; II y III) en relación con el comportamiento de los grupos controles, lo cual sugiere que la Solución CM-95 TM es un estimulador de la hematopoyesis medular

Tabla 3.7 Celularidad de la médula ósea (Media  $\pm$  S) en ratas Sprague-Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente ( $10^6$  células/mL)

Variantes	7 Días		28 Días		
	n=10	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S
NIVEL I		25,9 $\pm$ 0,7 c	18,6 $\pm$ 0,6 c	75,6 $\pm$ 0,7 c	67,8 $\pm$ 0,6 a
NIVEL II		34,1 $\pm$ 0,5 b	28,5 $\pm$ 0,8 b	49,1 $\pm$ 0,5 b	41,7 $\pm$ 0,8 c
NIVEL III		37,3 $\pm$ 0,7 a	31,3 $\pm$ 0,9 a	63,3 $\pm$ 0,4 a	51,6 $\pm$ 0,5 b
GSTM		26,3 $\pm$ 0,5 c	19,5 $\pm$ 0,6 c	30,0 $\pm$ 0,4 c	27,7 $\pm$ 0,6 d
GCN		21,6 $\pm$ 0,8 d	16,2 $\pm$ 0,9 d	21,7 $\pm$ 0,8 d	16,9 $\pm$ 0,5 e

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* ( $P < 0,05$ ) obtenidas por Duncan.

Estos resultados tienen una relación directa con la proliferación de células importantes de la respuesta inmune, cuyo origen es a partir de progenitores mieloides y linfoides originadas en la médula ósea a partir de células madres auto regeneradoras y pluripotenciales, por procesos de proliferación y diferenciación mediados por citocinas (factores estimulantes de colonias CSFs) (Abbas y col., 2000).

### 3.4.6 Parámetros hematológicos y bioquímicos

#### 3.4.6.1 Conteo total de leucocitos

En la Tabla 3.8 se observa el conteo global de leucocitos a los 7 y 28 días de tratamiento para los grupos experimentales. Como se muestra, los machos a los 7 días disminuyeron el número de leucocitos con el aumento de las inducciones magnéticas, se encontraron las tres dosis (Nivel I, II y III) por debajo del GSTM. Sin embargo, para los valores reportados en el GCN se pudo comprobar el aumento en el número de células blancas para el resto de los grupos. Las diferencias significativas se reportaron para los Niveles I y II en relación con el III y al GCN y del GSTM con respecto a los niveles II, III y al GCN ( $P < 0,05$ ). A los 28 días en los machos, el mayor número de leucocitos se obtuvo en el Nivel II y el mínimo en el Nivel III, mientras que el de los controles se encontraba entre ellos, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos

Las hembras a los 7 días presentaron un comportamiento similar a los machos en igual tiempo, disminuyeron el conteo de leucocitos con el nivel de tratamiento magnético, los tres niveles se situaron por debajo de los controles GSTM y GCN. Las diferencias significativas se presentaron entre el Nivel I y el III y entre los grupos controles en

relación con los Niveles II y III. A los 28 días las hembras disminuyeron sus valores con respecto a los 7 días de tratamiento, situándose los Niveles II y III por debajo de los controles pero no se registraron diferencias estadísticas entre los grupos. En ese parámetro se reportaron los mayores valores para los machos presentando diferencias con respecto a las hembras ( $P < 0,05$ ).

Como se observa la Solución CM-95 TM para los tres niveles de tratamiento magnético produjo disminución de leucocitos en la circulación sanguínea de ratas SPD, cuando se trataron durante 7 y 28 días en comparación con los controles. Este comportamiento sugiere que CM-95TM estimuló de forma inespecífica la migración de estas células hacia los tejidos y órganos linfoides, siendo creciente con el aumento de la inducción magnética aplicada a la Solución. Hubo diferencias significativas de los machos con las hembras a los 7 días de tratamiento ( $P > 0,05$ ).

Tabla 3.8 Conteo total de leucocitos (Media  $\pm$  S) en ratas Sprague Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente ( $10^9$  células/L).

Variantes	7 Días		28 Días		
	n=10	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S
NIVEL I		13,5 $\pm$ 3,0 ab	10,2 $\pm$ 2,3 ab	9,4 $\pm$ 2,6	9,2 $\pm$ 2,1
NIVEL II		12,4 $\pm$ 3,2 b	8,5 $\pm$ 1,5 b	11,4 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 1,1
NIVEL III		10,3 $\pm$ 1,4 c	7,8 $\pm$ 1,2 c	8,9 $\pm$ 2,4	7,3 $\pm$ 2,0
GSTM		15,2 $\pm$ 1,7 a	12,0 $\pm$ 1,8 a	10,5 $\pm$ 1,5	8,8 $\pm$ 2,1
GCN		9,8 $\pm$ 1,2 c	11,1 $\pm$ 3,6 a	10,2 $\pm$ 1,4	13,7 $\pm$ 0,8

Letras diferentes denotan diferencias significativa\* ( $P < 0,05$ ) obtenidas por Duncan.

### 3.4.6.2 Conteo diferencial de leucocitos

El conteo diferencial de leucocitos sanguíneos en machos y hembras a los 7 días se reportan en la tabla 3.9 y a los 28 días en la tabla 3.10. A los 7 días los machos presentaron el mayor número de polimorfonucleares neutrófilos en el Nivel III y el menor en el Nivel I, todos ellos reportaron valores superiores al grupo GSTM y menores que el GCN. Las diferencias significativas fueron de los Niveles II y III con respecto al Nivel I y al GSTM y del GCN con respecto a todos los grupos ( $P < 0,05$ ).

Las hembras a este tiempo tuvieron un comportamiento diferente que los machos; el casi todos los grupos registraron valores similares en el número de polimorfonucleares

neutrófilos excepto en el grupo GCN que fue significativamente superior que el resto de los grupos. Los machos exhibieron valores más alto en este parámetro, diferenciándose significativamente de las hembras ( $P < 0,05$ ).

El comportamiento en el número de linfocitos a los 7 días de tratamiento (tabla 3.9) fue similar en machos y hembras, sus valores disminuyeron con el nivel de magnetización, por lo que el menor número de linfocitos se observó en los Niveles II y III. En los machos, todos los grupos presentaron diferencias significativas con relación al GCN ( $P < 0,05$ ), pero no las hubo en las hembras y entre sexos.

Los monocitos se observaron en machos y hembras a los 7 días de tratamiento, según se muestra en la tabla 3.9. En los machos, los Niveles II y III mostraron valores más bajos que los de los grupos controles. Las diferencias significativas en los machos fueron entre el Nivel I, GSTM, GCN con el Nivel II, mientras en las hembras fueron entre el Nivel I, GSTM y GCN con respecto a los Niveles II y III y del GSTM en relación con el Nivel I y GGN. No hubo diferencias significativas entre sexos.

Tabla 3.9 Conteo diferencial de leucocitos (Media  $\pm$  S) en ratas Sprague Dawley inoculadas durante 7 días con CM-95 tratada magnéticamente

Variantes n=10	Sexo	Neutrófilos $\pm$ S	Linfocitos $\pm$ S	Monocitos $\pm$ S	Eosinófilos
NIVEL I	M	13,2 $\pm$ 2,6 c	83,0 $\pm$ 3,7 a	2,6 $\pm$ 1,3 a	1,8 $\pm$ 0,5
	H	10,6 $\pm$ 1,8 b	85,0 $\pm$ 3,3	2,4 $\pm$ 0,3 a	1,7 $\pm$ 0,6
NIVEL II	M	16,0 $\pm$ 2,0 b	81,5 $\pm$ 3,9 a	0,9 $\pm$ 0,4 b	1,5 $\pm$ 0,7
	H	11,9 $\pm$ 2,0 b	83,3 $\pm$ 2,2	1,1 $\pm$ 0,4 b	1,3 $\pm$ 0,4
NIVEL III	M	17,4 $\pm$ 2,0 ab	80,4 $\pm$ 4,5* a	0,8 $\pm$ 0,3 b	1,5 $\pm$ 0,5
	H	11,5 $\pm$ 2,7 b	82,3 $\pm$ 3,5	0,9 $\pm$ 0,3 b	1,8 $\pm$ 0,6
GSTM	M	13,4 $\pm$ 2,8 c	82,5 $\pm$ 3,5 a	2,8 $\pm$ 0,7 a	1,3 $\pm$ 0,9
	H	11,8 $\pm$ 2,7 b	84,6 $\pm$ 3,1	2,7 $\pm$ 0,8 a	1,9 $\pm$ 1,3
GCN	M	20,1 $\pm$ 2,3* a	75,6 $\pm$ 4,4 b	2,7 $\pm$ 0,7 a	0,9 $\pm$ 0,3
	H	15,2 $\pm$ 1,6 a	83,2 $\pm$ 3,6	2,3 $\pm$ 0,8 a	0,7 $\pm$ 0,4

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* ( $P < 0,05$ ) obtenidas por Duncan.

Los polimorfonucleares eosinófilos mantuvieron valores similares entre los grupos en los machos y hembras tratadas durante 7 días, sin diferencias estadísticas entre los

grupos y sexos (tabla 3.9). Los polimorfonucleares basófilos casi no se observaron en los grupos, pero sí la presencia de algunas células sanguíneas juveniles en los Niveles III, II y I (aumentaron en número según este orden) en hembras y machos (resultados no mostrados).

A los 28 días, el número de polimorfonucleares neutrófilos se mantuvo con un comportamiento similar que el observado a los 7 días, según se muestra en la tabla 3.10; sus valores aumentaron en machos y hembras con la inducción magnética. En los machos el Nivel III, presentó diferencias significativas en relación con el Nivel II y estos dos respecto al Nivel I y al GSTM. A su vez el GCN mantuvo estas diferencias con el Nivel I. Sin embargo, en las hembras las diferencias significativas fueron de los Niveles II y III con relación al Nivel I y al GSTM, además, del Nivel III comparado con el GCN ( $P < 0,05$ ). Se presentaron diferencias significativas entre machos y hembras, y fue más evidente en los machos ( $P < 0,05$ ).

Tabla 3.10 Conteo diferencial de leucocitos (Media  $\pm$  S) en ratas Sprague Dawley inoculadas durante 28 días con CM-95 tratada magnéticamente

Variantes n=10	Sexo	Neutrófilos $\pm$ S	Linfocitos $\pm$ S	Monocitos $\pm$ S	Eosinófilos $\pm$ S
NIVEL I	M	12,3 $\pm$ 1,4 c	82,0 $\pm$ 3,1 a	2,0 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4
	H	11,1 $\pm$ 1,4 b	84,6 $\pm$ 2,0	1,8 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,6
NIVEL II	M	16,3 $\pm$ 2,0 b	80,0 $\pm$ 3,0 a,b	1,7 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,8
	H	14,5 $\pm$ 1,7 ab	83,5 $\pm$ 3,9	1,4 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,5
NIVEL III	M	19,0 $\pm$ 3,4 ab	78,6 $\pm$ 4,0 b	1,9 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,5
	H	16,5 $\pm$ 3,2 a	81,0 $\pm$ 2,9	1,7 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,9
GSTM	M	11,1 $\pm$ 1,5 c	84,3 $\pm$ 2,6 a	2,3 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,6
	H	11,8 $\pm$ 2,5 b	85,0 $\pm$ 3,7	2,0 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,4
GCN	M	18,1 $\pm$ 1,0* a	78,4 $\pm$ 3,3 b	2,2 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4
	H	12,6 $\pm$ 1,8 b	84,2 $\pm$ 4,2	2,0 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,6

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* ( $P < 0,05$ ) obtenidas por Duncan.

El comportamiento de los linfocitos en los machos a los 28 días, (tabla 3.10) arrojó diferencias significativas del Nivel I y el GSTM con relación al Nivel III y al GCN

( $P < 0,05$ ), ya que los valores disminuyeron con la inducción magnética, siendo el Nivel III el de menor valor y próximo a este el del GCN. Las hembras, a este tiempo, para los tres niveles de inducción magnética mostraron valores más bajos que los controles, siendo más evidente para el Nivel III. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos, pero sí entre sexos, las hembras con valores superiores a los machos ( $P < 0,05$ ). Para los monocitos a los 28 días (tabla 3.10), los machos y las hembras mantuvieron valores más bajos que los grupos controles, de ellos el Nivel I fue el que se situó más cerca de ellos, sin diferencias significativas entre los grupos y sexos.

Los polimorfonucleares eosinófilos a los 28 días para machos y hembras mantuvieron valores similares entre los grupos, sin diferencias significativas entre ellos, ni entre sexos. No se reportaron polimorfonucleares basófilas a los 28 días, pero sí se observaron células sanguíneas juveniles en los tres valores de inducción magnética, en mayor medida que los grupos controles (resultados no mostrados).

Al hacer un análisis del comportamiento en el conteo diferencial de leucocitos hubo correspondencia con el obtenido en el conteo total de leucocitos. Es posible que la disminución producida por la Solución CM-95 TM sobre los leucocitos se deba a la disminución obtenida en el conteo de linfocitos y monocitos a medida que aumentó la inducción magnética. En el análisis histológico efectuado se observó aumento de la celularidad en órganos linfoides, lo que pudiera estar relacionado con la migración de células leucocitarias de sangre periférica a estos tejidos, y por otro lado, la transformación de monocitos a macrófagos por la acción de la sustancia CM-95 TM. Como es conocido, los leucocitos tienen la capacidad de circular e intercambiarse entre la sangre, la linfa y los tejidos para realizar sus funciones fundamentales, como la respuesta inmune, al localizarse como grupos anatómicos definidos de órganos linfoides (Abbas y col., 2000).

Si bien, los polimorfonucleares neutrófilos aumentaron a los 7 y 28 días con el grado de tratamiento magnético, sus valores fueron similares al GCN (animales sin tratar), lo cual indica que la acción de CM-95 TM sobre estas células no es tóxica. Como se conoce, los neutrófilos aumentan significativamente en las respuestas inflamatorias agudas provocadas por agentes infecciosos como los microorganismos por daño tisular local (Abbas y col., 2000).

Los eosinófilos no variaron significativamente entre los grupos experimentales a los 7 y 28 días de tratamiento. Un aumento de estas células estaría relacionado con la presencia de reacciones alérgicas, lo que es una muestra de que la Solución CM-95 TM en ninguno de los niveles de inducción magnética, indujo procesos alérgicos o la predisposición para reacciones de hipersensibilidad Tipo I. (Abbas y col., 2000). Resultado que a su vez está relacionado con el comportamiento de las células basófilas, las que también participan en estos procesos. La mayor frecuencia de aparición de los juveniles en los grupos tratados en ambos tiempos, con respecto a los controles, puede indicar la estimulación que está recibiendo la médula ósea roja, al aparecer estas células en sangre (Edelman, 1992).

### 3.4.6.3 Inmunocomplejos circulantes

Los valores obtenidos en los Inmunocomplejos circulantes (ICC), se muestran en la tabla 3.11a los 7 y 28 días de tratamiento para todos los grupos experimentales. Se observa como tendencia, en los machos y hembras a los 7 días de tratamiento un aumento en la formación de ICC para el grupo GSTM, lo que sitúa a los tres niveles de tratamiento magnético por debajo de este y cerca del GCN. Las diferencias significativas fueron del grupo GSTM con el resto ( $P < 0,05$ ).

Tabla 3.11 Inmunocomplejos circulantes (Media  $\pm$  S) en ratas Sprague Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente

Variantes	7 Días		28 Días		
	n=10	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S
NIVEL I		0,007 $\pm$ 0,001 b	0,009 $\pm$ 0,003 b	0,011 $\pm$ 0,003 b	0,010 $\pm$ 0,003 b
NIVEL II		0,010 $\pm$ 0,004 b	0,009 $\pm$ 0,005 b	0,018 $\pm$ 0,006 a	0,009 $\pm$ 0,004 b
NIVELII		0,009 $\pm$ 0,003 b	0,010 $\pm$ 0,004 b	0,009 $\pm$ 0,004 b	0,009 $\pm$ 0,004 b
GSTM		0,014 $\pm$ 0,002 a	0,014 $\pm$ 0,002 a	0,015 $\pm$ 0,003 a	0,014 $\pm$ 0,003 a
GCN		0,008 $\pm$ 0,005 b	0,010 $\pm$ 0,002 b	0,010 $\pm$ 0,003 b	0,010 $\pm$ 0,003 b

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* ( $P < 0,05$ ) obtenidas por Duncan.

A los 28 días, en los machos los grupos GSTM y el Nivel II mostraron valores similares, con diferencias significativas respecto a todos los grupos. Las hembras a este tiempo tuvieron los tres niveles de tratamiento magnético muy cerca del GCN. El

GSTM presentó diferencias significativas en relación con todos los grupos, así como. entre machos y hembras a los 28 días ( $P < 0,05$ ).

Como se observa, en este estudio, no se evidenciaron modificaciones importantes de los ICC a los 7 y 28 días, en los grupos donde se aplicó CM-95TM, se situaron estos cerca de los controles, a pesar de los efectos inmunoestimulantes de la Solución CM-95 TM. Como consecuencia de la estimulación inmunológica se han registrado efectos inflamatorios inducidos por diferentes sustancias, entre ellas el Adyuvante de Freund, el que produce artritis y otras lesiones en ratas (Vohr, 1995; Kimber, 1997), lo cual no fue observado en estos experimentos.

#### 3.4.6.4 Proteínas totales

Las proteínas totales en el suero sanguíneo de ratas SPD se muestran en la tabla 3.12 en machos y hembras para los grupos experimentales. Sus valores fueron aumentando con la inducción magnética en los machos a los 7 días, pero con valores inferiores a los controles GSTM y GCN, Hubo diferencias significativas entre todos los grupos y el Nivel I y del GCN con el Nivel II. En las hembras, los Niveles I y II se situaron por debajo de los controles, y el Nivel III con valores similares a ellos, las diferencias significativas fueron del Nivel III, GSTM y GCN con respecto al Nivel I, y entre el GCN y el Nivel I ( $P < 0,05$ ). Entre los controles no hubo diferencias estadísticas.

Tabla 3.12 Concentración de proteínas totales (Media  $\pm$  S) en ratas Sprague- Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente. (g/L).

Variantes	7 Días		28 Días		
	n=10	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S	Machos $\pm$ S	Hembras $\pm$ S
NIVEL I		58,6 $\pm$ 6,2 c	66,4 $\pm$ 4,6 b	67,9 $\pm$ 7,7	73,5 $\pm$ 6,7
NIVEL II		67,4 $\pm$ 6,8 b	70,0 $\pm$ 3,9 ab	69,7 $\pm$ 5,4	77,4 $\pm$ 6,0
NIVELIII		69,2 $\pm$ 7,5 a	77,4 $\pm$ 6,4 a	75,4 $\pm$ 6,7	77,1 $\pm$ 4,3
GSTM		71,1 $\pm$ 4,0 a	73,0 $\pm$ 4,1 a	73,7 $\pm$ 5,5	75,5 $\pm$ 7,0
GCN		74,8 $\pm$ 3,3 a	73,0 $\pm$ 5,2 a	73,0 $\pm$ 5,2	72,6 $\pm$ 6,9

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* ( $P < 0.05$ ) obtenidas por Duncan.

A los 28 días, en los machos (tabla 3.12), las tres inducciones magnéticas aumentaron sus valores en relación con los siete días, y acercaron sus valores aún más a los

controles. El Nivel I de todos ellos, mantuvo los valores mas bajos. No hubo diferencias significativas entre los grupos. En las hembras a este tiempo, los grupos tuvieron un comportamiento similar a los machos, pero no presentaron diferencias significativas entre ellos ni entre sexos.

En estos resultados se evidencia que las proteínas totales en el suero sanguíneo de las ratas tuvieron valores mas bajos para los niveles de tratamiento magnético durante 7 días (Niveles I, II y III) con respecto a los grupos controles, se estabilizaron los valores de estos grupos a los 28 días del tratamiento, lo que señala un posible cambio en el metabolismo de estas, fundamentalmente después de 7 días de tratamiento con CM-95 TM. Se ha reportado que el campo magnético puede acelerar el metabolismo celular, donde tienen una participación directa las proteínas (Fernández, 1998).

#### 3.4.6.5 Glucosa

En la tabla 3.13 se exponen los valores de la concentración de glucosa obtenidos en los grupos experimentales a los 7 y 28 días de tratamiento para machos y hembras. En los machos, a los 7 días, la concentración de la glucosa disminuyó con el nivel de magnetización, por lo que el mayor valor se obtuvo en el Nivel I y el menor en el Nivel III, pero por debajo de los controles, excepto en el Nivel I, el que se situó muy cerca de los mismos. El GCN presentó diferencias significativas en relación con el resto de los grupos ( $P < 0,05$ ).

En las hembras (7 días) el menor valor en la glucosa se obtuvo para el Nivel III y el mayor para el grupo GCN, las diferencias significativas fueron de todos los grupos con respecto al Nivel III ( $P < 0,05$ ). A los 28 días, la concentración de glucosa aumentó en todos los grupos. En los machos, el GCN se situó con valores superiores al resto de los grupos, pero solo las diferencias significativas fueron con respecto al Nivel III ( $P < 0,05$ ). En las hembras no se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos, los Niveles I, II y III se situaron muy cerca de los controles. Entre sexos hubo diferencias significativas; los machos exhibieron valores superiores a las hembras a los 7 y 28 días.

Los resultados obtenidos en la concentración de glucosa, cuyos valores fueron menores en los mayoría de los grupos tratados (Niveles II y III), con respecto a los controles, a los 7 días del tratamiento, posiblemente se deba a los efectos de CM-95TM

en la movilización de glucosa de la sangre a las células; comportamiento que no fue igual cuando se aumento la dosis hasta 28 días, en este caso los valores de glucosa aumentaron; hubo tendencia ala a la estabilización de los valores entre todos los grupos.

Tabla 3.13 Concentración de glucosa (Media ± S) en ratas Sprague - Dawley inoculadas con dosis repetida de CM-95 tratada magnéticamente (nmol/L)

Variantes	7 Días		28 Días		
	n=10	Machos ± S	Hembras ± S	Machos ± S	Hembras ± S
NIVEL I		8,9 ± 2,7 b	7,9 ± 3,2 a	11,1 ± 2,9 ab	10,6 ± 1,7
NIVEL II		6,8 ± 2,3 b	6,9 ± 2,2 a	11,3 ± 1,4 ab	10,1 ± 1,7
NIVELIII		6,5 ± 2,6 b	4,6 ± 1,3 b	10,1 ± 1,3 b	9,8 ± 1,3
GSTM		8,7 ± 4,0 b	7,7 ± 4,1 a	11,0 ± 2,9 ab	11,1 ± 1,6
GCN		12,7 ± 2,0 a	8,5 ± 2,3 a	13,4 ± 1,3 a	9,1 ± 1,8

Letras diferentes denotan diferencias significativas\* (P<0,05) obtenidas por Duncan.

### 3.4.7 Estudio anatomopatológico

La observación macroscópica efectuada a los 7 y 28 días del tratamiento no arrojaron lesiones de interés, ni en el sitio de inoculación (cavidad peritoneal) que pudieran relacionarse con la formación de granulomas macrofágicos, ni tampoco en la exploración general en cada uno de los órganos, que mantuvieron la textura y coloración normal.

Después de la necropsia practicada a los animales en los tiempos de tratamientos previstos, se le realizó el análisis microscópico a cada corte histológico obtenido de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, pulmones, corazón hígado y riñones, evaluados para cada grupo experimental. Sólo en los órganos del sistema inmune se encontraron cambios importantes a nivel de bazo, timo, y ganglios linfáticos mesentéricos, caracterizados por ligera hiperplasia linforreticular la que se hizo más evidente a medida que fueron aumentado las inducciones magnéticas en los Niveles del I al III. A su vez los cambios fueron más notables a los 28 días con respecto a los 7 días del tratamiento. En corazón, hígado, pulmones y riñones no se observaron lesiones de interés diagnóstico para ningún grupo.

A los 7 días para ambos sexos, en el Nivel III se observó el timo, con pérdida de los límites córticos medulares. Se hicieron mas evidentes las células de los corpúsculos de

Hassal. En los Niveles I y II se observó en grado creciente con la inducción magnética aplicada a la Solución CM-95, desde una ligera pérdida en los límites córticos medulares y ligero aumento de la corteza (Nivel I,) hasta una forma mas acentuada en la pérdida de los límites córtico medulares, predominando más la corteza (Nivel II).

En el bazo, para el Nivel III se destacó predominio de la pulpa blanca, con estructuras folículares no bien definidas y engrosamiento del tejido linforreticular. De la misma forma en el bazo del Nivel II, se distinguieron folículos en la pulpa blanca, haciéndose poco visible la zona marginal, aumento de las células linforreticulares y de la pulpa roja, lo que fue más discreto en el Nivel I.

En el Nivel III, para los ganglios linfáticos mesentéricos, se observaron las estructuras foliculares con la pérdida de sus límites y un incremento de la serie linfocítica entre otras células. En el Nivel II la zona cortical mostró pérdida en las delimitaciones de los folículos linfoides con hiperplasia celular, pero menos que en el Nivel III, mientras que en el Nivel I se observó menor pérdida en las delimitaciones de los folículos linfoides.

En los grupos donde se aplicó CM-95 STM (GSTM), los cambios observados en timo, bazo, y ganglios linfáticos mesentéricos, son aún más discretos y diferenciables de los que se produjeron fundamentalmente en los Niveles II y III, con un comportamiento muy parecido al obtenido en el GTM1, para estos órganos.

A los 28 días el análisis histológico arrojó cambios a nivel del timo con hiperplasia celular, pérdida de los límites corticomedulares, con predominio de la corteza y médula a demás de hacerse muy evidentes los corpúsculos de Hassal. Se destacó la proliferación del tejido linfoide con congestión de los vasos, resultados que se observaron más acentuados en el Nivel III (figura 3.19) y menor en los Niveles II y I (figuras 3.18 y 3.17 respectivamente). En los grupos controles GSTM (figura 3.16) y GCN se observó la zona cortical y medular con una arquitectura histológica normal.

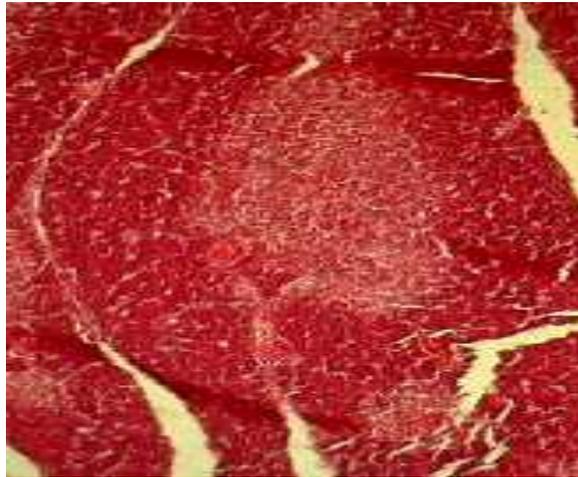


Figura 3.16 Rata SPD hembra del GSTM a los 28 días de tratamiento con CM-95 STM. Timo con definición de contornos entre zona cortical y medular con células linforreticulares. H. E. x 30.

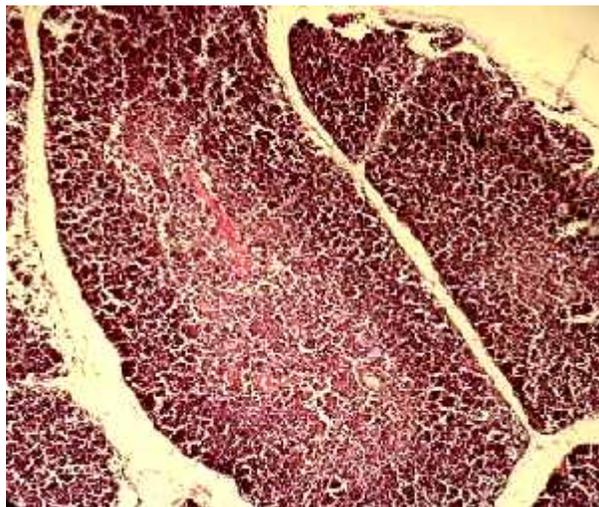


Figura 3.17 Rata SPD macho del Nivel I a lo 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Timo con zona cortical y medular aumentada de forma discreta e hiperplasia celular (células linforreticulares). H. E. x 40.

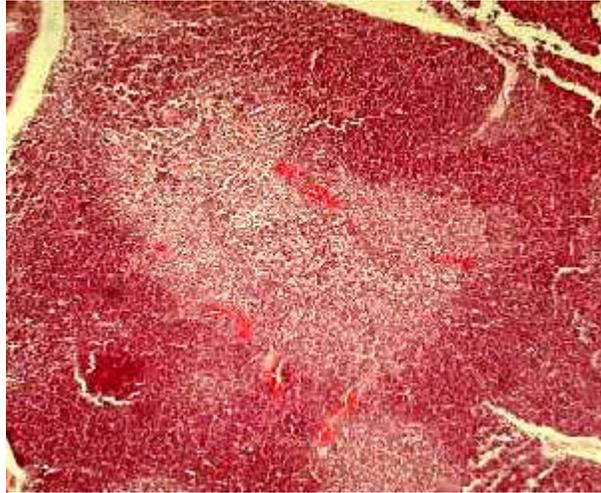


Figura 3.18 Rata SPD macho del Nivel II a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Timo con zona cortical y medular aumentada e hiperplasia celular (células linforreticulares). H.E. x 30.

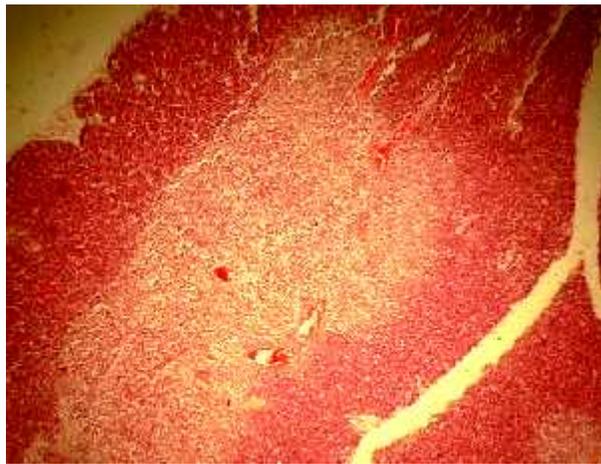


Figura 3.19 Rata SPD hembra del Nivel III a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Timo con zona cortical y medular aumentada e hiperplasia celular (células linforreticulares). H. E. x 30.

En el Nivel I para el GTM4 (figura 3.22), se observó en el bazo, la pulpa blanca abundante, con folículos de variados tamaños y alargamiento de su estructura, así como pérdida de la zona marginal, en los otros Niveles (II y III) (figuras 3.23 y 3.24 respectivamente), se observaron folículos no bien definidos con predominio de una hiperplasia celular (pulpa blanca). En los grupos GCN (figura 3.20) y GSTM (figura 3.21) se observaron estructuras foliculares definidas en la zona de la pulpa blanca.



Figura 3.20 Rata SPD macho en el GCN a los 28 días (sin tratamiento). Bazo con estructuras folícu­la­res en la pulpa blanca, zona marginal definida y presencia células linfoides. H.E. x 40.



Figura 3.21 Rata SPD hembra en el GSTM a los 28 días de tratamiento con CM-95 STM. Bazo con estructuras folícu­la­res en la pulpa blanca, zona marginal definida y presencia de células linfoides. H.E. x 40.

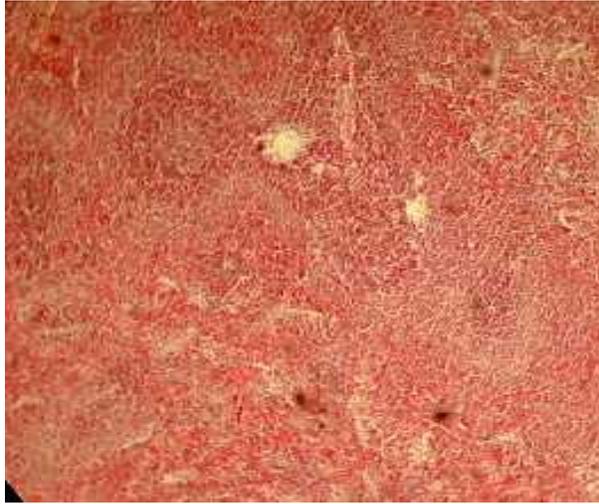


Figura 3.2.2 Rata SPD macho Nivel I a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM Bazo con predominio de la pulpa blanca, estructuras foliculares y zona marginal poco definidas, abundantes células linfoides. H.E. x 30.

Santos y col. (1997) reportaron un aumento en la zona de la pulpa blanca del bazo cuando se trataron ratones Balb/c con la sustancia CM-95 TM como adyuvante inmunológico, inoculada en un esquema de inmunización frente a un antígeno bacteriano.

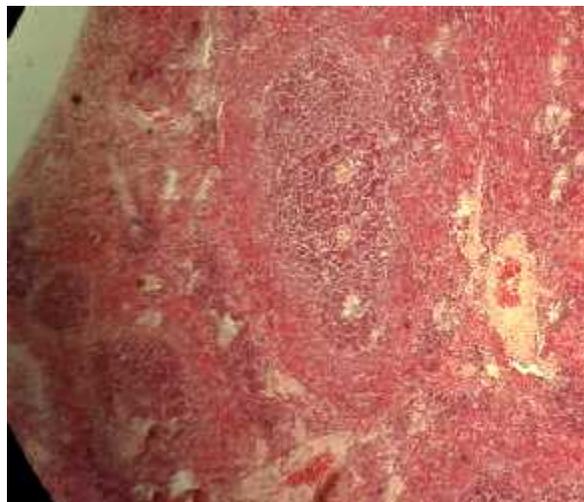


Figura 3.23 Rata SPD macho Nivel II a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM Bazo con predominio de la pulpa blanca, estructuras foliculares con hiperplasia celular, abundantes células linfoides. H.E. x 30.



Figura 3.24 Rata SPD hembra Nivel III a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Bazo con predominio de la pulpa blanca, estructuras foliculares con hiperplasia celular, zona marginal poco definida, abundantes células linfoides. H.E. x 30.

En los ganglios linfáticos mesentéricos, se observa poca definición de las estructuras foliculares e hiperplasia celular con aumento del tejido linforreticular y fibroconectivo, en los Niveles I y II (figuras 3.27; 3.28.respectivamente), lo que fue mas acentuado para el Nivel III (figura 3.29)

En las figuras 3.25 y 3.26 se muestran los resultados del GCN y GSTM correspondiente a los cortes histológicos de los ganglios linfáticos mesentéricos, son notables folículos linfoides en la zona cortical, de estructuras definidas con celularidad normal.

Los resultados obtenidos en los grupos controles a los 28 días de tratamiento, para todos los órganos linfoides, fueron mucho mas visibles que a los 7 días, pero discretos con relación a los niveles de tratamiento magnético y similares entre ellos para todos los órganos del sistema inmune.

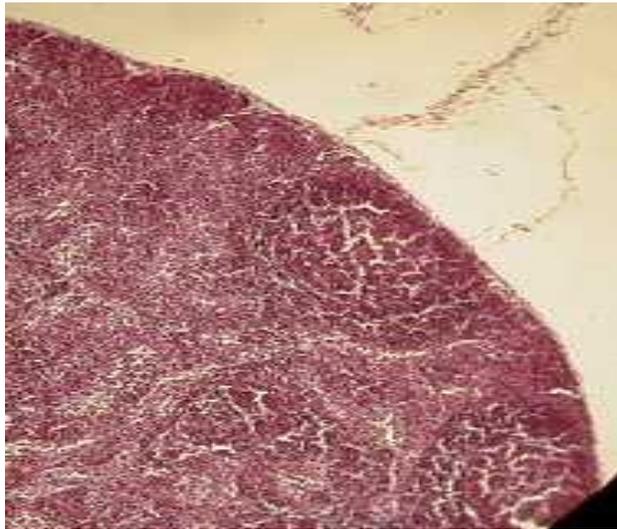


Figura 3.25 Rata SPD hembra GCN. 28 días (sin tratamiento). Ganglio linfático mesentérico con folículos linfoides definidos en la zona subcapsular, presencia de células linforreticulares. H.E. x 40.

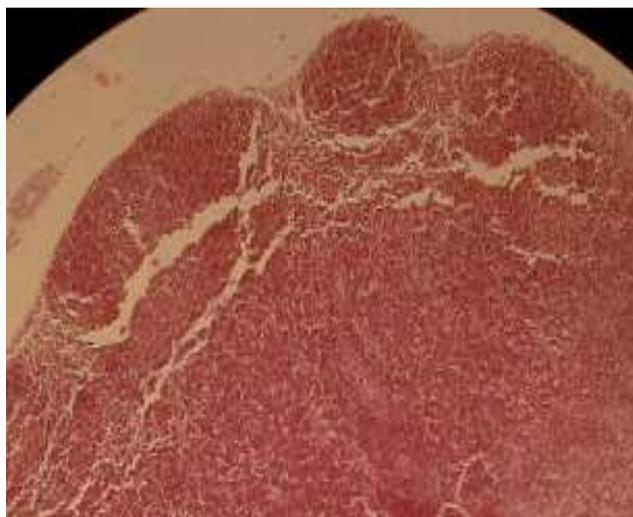


Figura 3.26 Rata SPD macho del GSTM a los 28 días de tratamiento con CM-95 STM Ganglio linfático mesentérico con folículos linfoides definidos en la zona subcapsular. H.E. x 30.

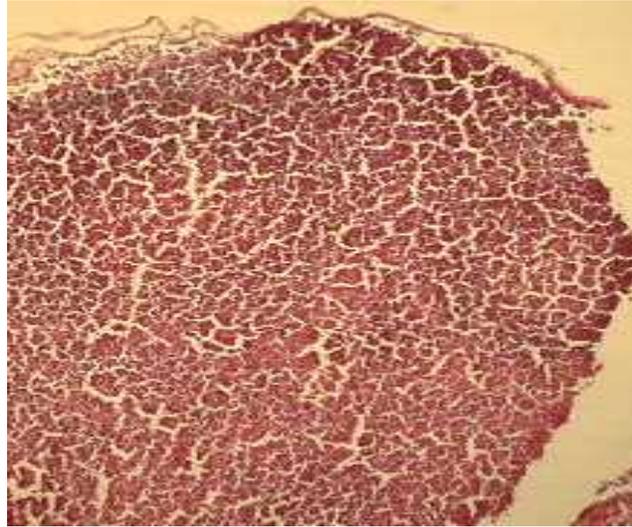


Figura 3.27 Rata SPD hembra Nivel I. a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Ganglio linfático mesentérico con pérdida de los límites en folículos linfoides de la zona cortical y aumento de células linforreticulares. H. E. x 40.

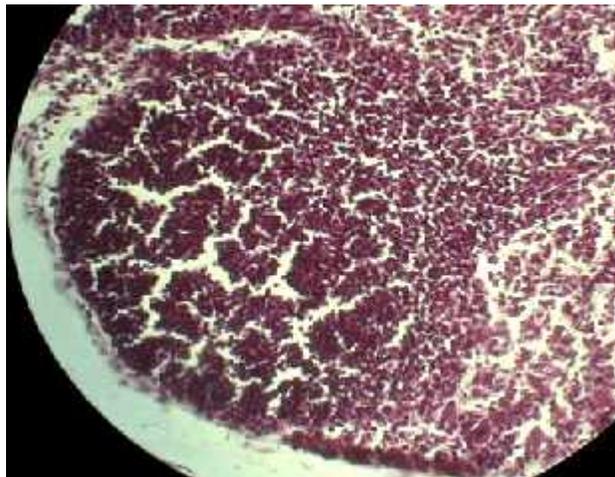


Figura 3.28 Rata SPD macho Nivel II. a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Ganglio linfático mesentérico con pérdida de los límites en folículos linfoides de la zona cortical, con hiperplasia celular y aumento de células linforreticulares. H. E. x 40.

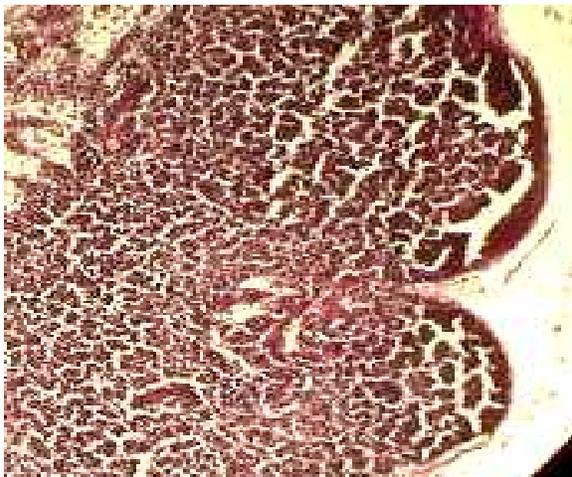


Figura 3.29 Rata SPD hembra Nivel III a los 28 días de tratamiento con CM-95 TM. Ganglio linfático mesentérico con pérdida de los límites en folículos linfoides de la zona cortical con hiperplasia celular y aumento de células linforreticulares. H. E. x 40.

Estos resultados demuestran la tolerancia local y sistémica de la Solución CM-95 TM en las dosis utilizadas para los exámenes macroscópicos y microscópicos efectuados, y apuntan hacia la estimulación de la hematopoyesis medular donde se originan las células de la respuesta inmune. Se puede plantear la posible migración y/o proliferación de células leucocitarias de sangre periférica en los órganos inmunológicos, por acción inespecífica de CM-95 TM, al existir un balance entre la hematopoyesis medular y la circulación sanguínea de células blancas de la sangre (resultados del conteo global y diferencial de leucocitos y los análisis histológicos).

Otra característica importante que puede dar explicación a la seguridad manifestada por esta sustancia es su naturaleza simple, no necesita de un proceso biodegradativo que pudiera desencadenar toxicidad a nivel hepático, y puede ser asimilada fácilmente por el organismo, a lo que se une la *reversibilidad* en el tiempo una vez aplicado el tratamiento magnético a la Solución CM-95 (Anexo II). Por lo que, los efectos que produjo CM-95 TM, demostrados en este trabajo, pueden llevar a alteraciones reversibles transitorias, que después de transcurrido el tiempo de relajación, vuelven al estado inicial o de compensación, lo que minimiza los posibles efectos secundarios de esta solución, por permanencia de su acción en el tiempo. Aunque en los estudios toxicológicos no se hizo evaluación del tiempo de reversibilidad de los efectos del tratamiento magnético para estos esquemas de inoculación (7 y 28 días), si se

observó como tendencia una estabilización de muchos de los parámetros evaluados hacia los 28 días de tratamiento, acercando sus valores próximo al de los controles.

Rapacholi y col. (2003) señalaron que para que un cambio biológico y/o fisiológico producido por un campo magnético, no tenga consecuencias genuinas de salud debe ser reversible y estar en el rango que produzca mecanismos efectivos de compensación.

Los resultados relacionados con los efectos de CM-95 TM sobre el timo se corroboran con la proliferación de células de forma acentuada, principalmente dentro de ellas los linfocitos T. Es conocida la importancia funcional del timo, durante los procesos de maduración y selección de linfocitos T timo- dependientes, que luego migran hacia órganos periféricos, fundamentalmente hacia el bazo y ganglios linfáticos, como células inmunocompetentes (Abbas y col., 2000). A su vez el timo es un órgano que percibe los cambios que pueden producir las sustancias inmunoestimulantes. Selgrade (1995) señaló que como resultado de la inmunoestimulación incremento de la corteza y la pérdida de los contornos de esta y de la médula, lo cual de alguna manera se observó en el estudio histopatológico efectuado como efecto de CM-95 TM.

En el bazo de los animales tratados con CM-95 TM, se observó aumento de la linfoproliferación con hiperplasia celular de estructuras foliculares (pulpa blanca), lo cual también ocurrió en los ganglios linfáticos mesentéricos en la zona de la corteza para los folículos linfoides mesentéricos. Todo parece indicar que la estimulación de la médula ósea y la migración de células hacia estos órganos pudieran ser por la estimulación inespecífica de CM-95 TM.

En el caso de los ganglios linfáticos circulan las células hacia y desde los órganos linfoides (fundamentalmente linfocitos) a través de la linfa (Reid, 1991). La cavidad peritoneal fue la zona de inoculación de CM-95TM, la linfa procedente de esta zona puede llegar hasta los ganglios mesentéricos y trasladar hasta ellos células.

En los resultados obtenidos se registraron diferencias significativas entre los sexos, lo cual es esperado debido a las diferencias fisiológicas existentes entre machos y hembras, que siempre se han tenido en cuenta para los estudios toxicológicos (Koeter, 1995)

Aun cuando hubo cambios significativos en los parámetros evaluados para los tres niveles de tratamiento magnético con respecto a los controles, estos se mantuvieron

dentro de los parámetros normales para la edad y sexo de las ratas SPD utilizadas en este trabajo, reportado por NC-CENPALAB (1998) e IFFA CREDO (1999).

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el tratamiento magnético aplicado a la Solución CM-95, probablemente indujo cambios significativos en ella, que de alguna manera pudieron ser responsable del comportamiento obtenido en las variables biológicas medidas, con respecto a la misma Solución sin tratar magnéticamente. Es más acentuado este hecho para la mayor inducción magnética (0,12 T) y velocidad de flujo (0,3 m/s) utilizada. Se observó que, CM-95 sin tratar magnéticamente en varios de los parámetros analizados tuvo un comportamiento diferente que el GCN, lo que puede ser justificado por sus efectos fisiológicos en el equilibrio osmótico celular, al ser utilizada como fármaco (Centro para el Desarrollo de la Farmacopea, 2003)

Es posible relacionar los bioefectos producidos por la Solución CM-95 TM en los parámetros bioquímicos del suero sanguíneo de ratones Balb/c (concentración de glucosa, proteínas totales e iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ ), con los efectos que indujo CM-95 TM sobre diversos componentes de la respuesta inmune, en su acción inmunopotenciadora como son: la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales, la proliferación y diferenciación de células de la respuesta inmune, la síntesis de citocinas como  $\text{INF}\gamma$ , anticuerpos y la activación en la hematopoyesis medular. Se debe tener en cuenta que la glucosa es fundamental en los mecanismos de fagocitosis dependientes del oxígeno para la eliminación de agentes extraños, por lo que es necesario incrementar la demanda de glucosa para su oxidación por la vía de la hexosa monofosfato, que aporta el ATP y la NADPH para la formación de metabolitos reactivos del oxígeno en los procesos de fagocitosis (Jarmila y col., 1993). Además, esta biomolécula aporta la energía necesaria (glucogenólisis), junto con otros procesos catabólicos, para el transporte de iones (bombas), y otros procesos metabólicos (síntesis). Específicamente el ión calcio como activador del metabolismo celular, puede incidir en el transporte de iones, síntesis, división, diferenciación y proliferación celular (Lozano, 1997), de los cuales dependen los mecanismos inmunológicos.

En las condiciones ensayadas se resumen los efectos de la Solución CM-95 TM como inmunopotenciador, en la capacidad de estimular la respuesta humoral con la producción de anticuerpos de la clase IgG y las subclases IgG1 e IgG2a en ratones frente a antígenos bacterianos, pero también, estimular la inmunidad mediada por células en la producción del INF $\gamma$ , la reacción de HRT y en la participación de linfocitos CD4<sup>+</sup> cooperadores MHC de clase II para la producción de los anticuerpos antibacterianos, lo que coincide con lo planteado por Abbas y col. (2000).

Como se discute anteriormente, en los resultados obtenidos por CM-95 TM en la estimulación inmunológica participaron elementos propios de un patrón de respuesta Th2, cuando fue capaz de inducir la producción de anticuerpos antibacterianos murinos de la subclase IgG1, pero fue mayor la participación de elementos del patrón de respuesta Th1, al inducir la producción de anticuerpos de la subclase IgG2a, la HRT y secreción de INF $\gamma$ ). De estos resultados se infiere que el patrón preferencial que induce CM-95 TM al estimular la respuesta inmune es Th1. Diferentes científicos han reportado los elementos fundamentales que participan en los patrones de respuesta Th1 y Th2, coincide con estos resultados los citados por O<sup>1</sup>Garra y col.(1989); Fresno y col. (1997); Casalnuovo y col. (2000).

Aun cuando se discute el posible mecanismo de acción de la Solución CM-95 TM sobre diferentes elementos de la respuesta inmune, en comparación con otros inmunopotenciadores convencionales, este tiene características sui géneris ya que esta presente el efecto del tratamiento magnético, quien indudablemente puede ser el móvil para que se hayan logrado los bioefectos y la estimulación inmunológica ya discutida. Si se tienen en cuenta las hipótesis planteadas por diferentes científicos sobre los bioefectos del campo magnético (Blank y Goodmand, 1997; Bardasano, 2000), se puede plantear la hipótesis que la Solución CM-95 después de tratada magnéticamente puede cambiar sus propiedades físico-químicas, resultado que coincide con el citado por Rodríguez y col, 1998. El cambio de estas propiedades depende de los parámetros del CME y de las características de la sustancia tratada. Presuponemos que el mecanismo de acción de la Solución CM-95 TM sea por interacción de esta con las células, lo que puede inducir cambios conformacionales y funcionales en las biomoléculas cargadas

(PIM, fosfolípidos y enzimas) y así repercutir en el flujo de iones (bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) y en la actividad enzimática. Si además, esta solución tratada tuvo efectos en la liberación del ión calcio en el citoplasma, se podría explicar la aceleración del metabolismo celular, incluyendo la división y proliferación celular que se obtiene con la aplicación de CM-95 TM.

Por otro lado, si se tiene en cuenta que el sistema inmune funciona a través de células que tienen su fisiología preparada para la producción de proteínas, localizadas como receptores de membrana (TCR, moléculas de adhesión, moléculas del MHC), citoquinas, proteínas del suero sanguíneo (Sistema complemento, enzimas, anticuerpos) o las enzimas lisosomales de células fagocíticas (macrófagos y PMN), entre otras. Se podría inferir que la señal del campo magnético llegó hasta el ADN de las células, por interacción de la Solución CM-95 TM con ellas, actuando sobre los mensajeros secundarios hasta activar la transcripción del ADN y por tanto, la biosíntesis de proteínas, para lograr amplificar la respuesta inmune de forma significativa y diferente que cuando se utilizó la Solución CM-95 sin tratamiento magnético.

El aumento de la síntesis proteica encontrada con la CM-95 TM también ha sido demostrado a nivel molecular, en células de promielocitos expuestas a radiaciones de radiofrecuencia (Maercker y col., 2003).

Los resultados obtenidos dan un alcance teórico práctico a las aplicaciones del sistema acuoso CM-95 TM en Inmunología, ya que se podría contar de forma inmediata con un nuevo adyuvante inmunológico, como un aspecto novedoso dentro la Inmunotecnología, en la obtención de biológicos para el diagnóstico, o como inmunopotenciador de forma mediática para la inmunoterapia; aplicaciones que dependen en gran medida de la eficacia y seguridad demostrada en esta sustancia al aplicarle tratamiento magnético.

Estos resultados han brindado la posibilidad de usar por primera vez esta sustancia tratada con la mayor inducción magnética del rango escogido (GTM4), como adyuvante inmunológico para la obtención de seis sueros policlonales anti Bacillus, en proceso de validación en Cuba para el control de calidad de Biopreparados de uso agrícola en los diferentes niveles del proceso productivo. El uso de estos sueros puede extenderse para el control microbiológico en materiales de laboratorio y locales estériles.

## CONCLUSIONES

- Se comprobó que la Solución CM-95 TM con la mayor inducción magnética (0,12 T) y velocidad de flujo (0,3 m/s) aceleró la incorporación de glucosa en el intestino de ratas *Sprague Dawley* y varió el comportamiento de parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones Balb/c.
- La Solución CM-95 TM estimuló la inmunidad humoral, a través de la producción de altos títulos de anticuerpos antibacterianos, en ratones Balb/c y Conejos NZB, y la formación del isotipo murino IgG y las subclases IgG1 e IgG2a.
- La Solución CM-95 TM con la mayor inducción magnética (0,12 T) y velocidad de flujo (0,3 m/s), se comportó como un adyuvante inmunológico en la obtención de seis sueros policlonales anti *Bacillus* en conejos Nueva Zelandia Blancos, inmunizado por vía I.V.
- La Solución CM-95 TM potenció la respuesta inmune mediada por células, a través de la proliferación de CMNPs humanas, cultivadas *in vitro* y la activación de macrófagos peritoneales, los que aumentaron en número por estimulación específica e inespecífica, activaron su enzima lisosomal fosfatasa ácida y la fagocitosis, así como estimuló la hipersensibilidad retardada y la secreción de INF $\gamma$ .
- La evaluación preliminar de la toxicidad e inmunotoxicidad en la Solución CM-95 TM a dosis repetida, en ratas *Sprague Dawley*, arrojó una alta tolerancia local y sistémica, no se observaron signos clínicos y lesiones de predicción diagnóstica en los parámetros analizados, pero si alteraciones en la citoarquitectura celular a nivel de los órganos linfoides.

## **RECOMENDACIONES**

- Proponer la realización de protocolos de ensayos preclínicos para evaluar la acción inmunopotenciadora de la Solución CM-95 tratada magnéticamente, como preámbulo de la fase clínica para su aplicación en la terapia.
- Evaluar el efecto de la Solución CM-95 TM como adyuvante inmunológico con otros antígenos, que permita extender su aplicación en la obtención de otros inmunobiológicos (Anticuerpos Monoclonales y/o sueros policlonales).
- Realizar en las instituciones autorizadas del país el registro de la Solución CM-95 TM como inmunopotenciador (adyuvante inmunológico).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- -Abbas A.K., Lichman A.H., Pober J.S. Inmunología Celular y Molecular. 3<sup>ra</sup> edición. Madrid. Interamericana. McGraw-Hill. (2000).
- Adey W. R. Tissue interaction with non- ionising electromagnetic fields. *Physiol Rev.*61, 435-514 (1981).
- Aguado T., Engers H., Dang T., Pink R. Novel adjuvants currently in clinical testing. Foundation Merieux Annecy. France A Meeting Sponsored by the World Health Organization. *Vaccine.* 17, 2321-8 (1999).
- Aguilar J.C., Leal M.J. Adyuvantes vacunales. Estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología Aplicada.*17 (3), 148-151 (2000).
- Alving C.R. Lipopolysaccharide Lipid A and liposome containing Lipid a as immunological adjuvants. *Immunobiol.* 187, 430-46 (1993).
- American Conference of Government Industrial Hygienists (ACGIH). Documentation Thres Holt limit values. Circinate. (1994).
- Anónimo. Proyecto de Norma Oficial mexicana para el sacrificio humanitario de los animales de laboratorio (NOM). Revista informativa de alta tecnología. *Animales de Experimentación.* 2 (1), 10-8 (1996).
- Aucouturier J., Dupuis L., Ganne V. Adjuvants designed for veterinaria human vaccine *Vaccine.* 19, 2666-72 (2001).
- Azanza M.J. Campos Magnéticos y calcio. Evaluación de riesgos. Congreso sobre radiaciones no ionizantes en Biología y Medicina Instituto de Bioelectromagnetismo Alonso de Santa Cruz. España. (1992).
- Azanza M.J., Del Moral A. Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Progress in Neurobiol.* 517-601 (1994).

- Azuma I. Synthetic immunoadjuvant applications to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 10, 1000-6 (1992).
- Bacttolectti J.H. Exposure of Rhesus Monkeys to 2000G. Steady magnetic fields. Effects on blood parameters. *Med. Physiol.* 8, 115-18 (1981).
- Baker J.S., Judds J. Magnetic amelioration of scale formation. *Water Research*. 30 (2), 247-60 (1996).
- Baldridge J.R., Grane R.T. MPL formulations for the next generation of vaccines. *Methods*. 19, 103-7 (1999).
- Bardasano J.L. Homenaje al Instituto de Bioelectromagnetismo Alonso de Santa Cruz. X aniversario de su creación. Ediciones IBASC. Universidad de Alcalá. (1999).
- Bardasano J.L. Bioelectromagnetismo. Ciencia y Salud. Serie Mc.Graw-Hill de divulgación científica. Madrid. España (2000).
- Barrett A.R., Parsons S., Hillis P. A review of some of the analytical methods used to asses the influence of magnetic treatment. Grandfield University. Magnetic Treatment in Static and Flowing Systems. *Magnetic*. 3 (4), 1-30 (1999).
- Batista D.A., Pascual J.R. Adyuvantes vacunales. Evaluación preclínica inmunotoxicológica. Toxicología Regulatoria. X Congreso Latinoamericano de Toxicología. Palacio de las Convenciones .Habana .Cuba .24-27 Nov. Libro Resumen. 191-98 (1998).
- Bayo J.V., Mant Y., Know J.E., Pallares S. Tratamiento metabólico de las infecciones genitales por papiloma virus humanos (PVH). Dieta polarizante y magnetoterapia. *Infectol*. 11, 593-607 (1991).
- Bazón P. La magnetoterapia en la hepatitis viral. Trabajo en opción al titulo de Especialista de 1er Grado en Medicina Integral General. Villa Clara. Cuba. (1993).

- Berd H.C., Maguire H.C., Bloome E. Regression of lung metastasis after immunotherapy with autologous DNP modified melanoma *Vaccine Proc Soc Clin Oncol. Abstract.* 17, 43-9 (1999).
- Berd D. Autologous hapten – modified. Vaccine as a treatment for human cancer. *Vaccine.* 19 (6), 2565-70 (2001).
- Bermothly M.F., Reduction of radiation mortality through magnetic pre-treatment. *Natur.* 200, 279-80 (1963).
- Bernan P., Powell M., Francis D., Niao D. QS- 21 promotes and adjuvants effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. Evaluations group vaccine. *Vaccine* 19, 2086-88 (2001).
- Bersani F., Marinielli F., Ognibene A., Mahenci A. Intramembrane Particle IMP redistribution in cell cultures exposed to ELF pulsed magnetic fields. In Brighton et. End.Pofback SR (eds). *Electromagnetic in Medicine and Biology.* San Francisco. San Francisco Press. 117-20 (1997).
- Bersani F., Cossariza A., Fran Cesbhi C. Effects of ELF pulsed electromagnetic field on immunocompetent cell in vitro studies. *Alta Frecuenzia.* 58,375-380 (1989a).
- Bersani F., Cossariza A., Monti D., Catini M., Codiz R., Sacchi A., Francishi C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic field increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subject. *Biochem. Biophys. Res Common.* 160: 602-8 (1998 b).
- Bersani F., Marinielli F., Ognibene A., Matteucci A., Cecchi A., Santi S., Squiar Z.S., Mario M. Intramembrane protein. Distribution in cell culture in affected by 50 Hz pulsed magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 18, 463-69 (1999).
- Bistolfi F. *Campi magnetic in medicine.* Edizioni Minerva. Torino. (1983).
- Blank M., Soo L., Lin H., Hederson A.S., Goodman R. Changes in transcription in HL-60 cells following exposure to alternating currents from electric fields. *Biochem- Bioener.* 28, 301-9 (1992).

- Blank M. Electric and magnetic fields. Signal Transductions in the membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. *Adv. Chem.* 250-339 (1995 a).
- Blank M., Soo L., Pasptein V. Effects of low frequency magnetic fields on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. *Bioelectrochem. Bioeng.* 38, 267-73 (1996).
- Blank M., Goodman R. Do electromagnetic field interact directly with DNA? *Bioelectromagnetics.* 18, 111-15 (1997).
- Bohn G., Sing A., Zunbihi R. IL-18 (INF $\gamma$ ) inducing factor regulate early cytokine production in and promote resolution of bacterial infection in mice. *J. Immunol.* 160, 299-301 (1998).
- Cadosi R., Bersani F., Cossariza A., Zucchini P., Emilia G., Torelli G., Francushi C. Lymphocytes and low frequency electromagnetic field. *FASEB J. G.* 2667-74 (1992).
- Casalnuovo I.A., Gaziano R., Difranco P. Cytokine pattern secretion by murine spleen cell after inactivated *Candida albicans* immunizations. Effects of cocaine and morphine treatment. *Immunopharmacol and toxicol.* 22 (1), 35-38 (2000).
- Castillo F. El ratón como animal de laboratorio. Ediciones Ciencias Médicas. La Habana Cuba. (1985).
- Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología. Formulario Nacional de medicamentos Ministerio de Salud Pública. Cuba. (2003).
- Chiabrera A.C., Nicole H.P. Interaction between electromagnetic fields and cells. Advances Sciences. Institute Serie A. *Life Science.* 97, 76-80 (1984).
- Cho H.J., Takabayashi K., Cheng P.M., Nguyen M.D., Corn M., Tucks S. Immunoestimulatory DNA based Vaccine induce cytotoxic. lymphocyte activity by T-helper cell independent mechanism. *Nat. Biotechnol.* 18 (59), 509-14 (2000).
- Cobas G., Sarmiento R., Martínez C.E., Esnard S.C. Aislamiento y separación del LPS de la cepa MP-275 de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Cub. de Quím.* 9 (1), 61-5 (1997).

- Cohen A.D., Bayer J.D., Weriner B.D. Modulation The Immune Response to genetic immunization. *FASEB. Found F.* 12 (15), 1611-26 (1988).
- Colectivo de Autores. Tribuna Médica. Efectos del campo magnético. Revista Tribuna Médica. Universidad de Valencia. 20-32 (1989).
- Colic M., Goleta S.C. Molecular mechanism of magnetic water treatment. Grandfield University. (1999).
- Committee Property Medicinal Products (CPMP). Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and toxicological Testing of Vaccine. London. 17 Dic. CPMP/SNP 4565/95 (1997).
- Cooper P.D. The selective induction of different immune responses by Vaccines adjuvants. Strategies in Vaccines Design. *Vaccine.* 9, 125-58 (1994).
- Cossariza A., Monti O., Bersani F., Paganelli R., Montag N. G., Cadossi R., Contini M., Franeschi C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase interleukin- 2 ( IL-2). Utilization and IL-2 receptor expression in mitogen. Stimulated human lymphocytes from old subjects. *FEBS IETT.* 248, 141-44 (1989).
- Cossarizza A., Angioni S., Petraglia F., Genazzani A.K., Monti D., Capri M., Bersani F., Cadossi R, Franeschi C. Exposure to low frequency pulsed electromagnetic fields increases interleukin-I and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cell. *Exp cell Res.* 204, 385-87 (1993).
- Dantos C.M., Queiroz C.S. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitors cells of mice infected with *Listeria monocytogenes* INT. *J. Immunopharmacol.* 21, 609-11 (1999).
- Del Moral A., Azanza M.J. Model for the effect of static magnetic field on neurons. *J Magnetic.* 5, 114-18 (1992).
- Dupré L., Kremer L., Isabelle W., Riveau G., Capron A., Lochtr C. Immunomodulatory effect of IL-18 encoding. Plasmid in DNA. Vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.* 19 (8), 1373-80 (2001).

- Edelman R. An uptake on vaccine adjuvants in clinical trial AIDS, *RES Human Retrovirus*. 8, 1409-11 (1992).
- Eichwald C., Walleczek J. Activation – dependent biphasic electromagnetic field effects. Model based on cooperative enzyme. Kinetics in cellular signaling. *Bioelectromagnetics*. 17 (6), 427-35 (1996).
- Elssasser B.V., Lusebrenk S., Grisenmeyer T., Wrtevawer N., Shultze S.W. Comparison of the effects of various clinically applied Mistetloe preparation on peripheral blood leucocytes. Anneimite L Forschung. *Vaccine* 48, 1185-89 (1998).
- Elekes E., Thuroczy G., Szabó L.D. Effect on the Immune System of mice exposed chronically to Hz amplitude modulated 2.45 GHZ. *Bioelectromagnetics*. 17 (3), 246-88 (1996).
- Ericsson K., Bin Sun J., Norstrong I., Fredikson M., Linblad M., Li B.L., Hoinmyren J. Coupling of antigen to cholera toxin for dendritic cell vaccination promote the induction of MHC class I retracted cytotoxic T cell and the rejection of the cognate antigen- expressing model tumor *Eur. J. Immunol*. 24 (5), 1272-81 (2004).
- Esnard S.C, Marrero M. L. Tipificación serológica de *Pseudomonas aeruginosa* resistencia a antibióticos del Serotipo predominante. *Boletin Epidemiol* .1, 1-6 (1992).
- Evans T.G., Mc Elrath M. J., Mathew S.T., Montefron D., Weinhold M., Wolf M.C., Keefer E., Kavis G., Gorey L., Gorse G., Bushe R., Graham B. S., Spearman P.W., Scwatz P. M., Muclyan J., Goespport P., y col. QS-21 promotes and adjuvants effect a allowing for reduced antigen dose during HIV –1 evelope subunit immunization in humans Vaccine evaluation group. *Vaccine*. 19, 2080-85 (2001).
- Famboaim L., Sáez M.L. Introducción a la Inmunología Humana. 3ra Edición. Editorial Morby. Barcelona. España. (1996).
- Fernández M.G. Radiaciones no ionizantes. Los campos magnéticos de las líneas de alta tensión y sus posibles efectos sobre salud y el medio ambiente.

- Memorias del 4to Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear. Tomo IV. IRPA .19-23 Octubre. CIEMAT Ministerio de la Industria Española y Energía. 17-1, 17-23 (1998).
- Font A. Diseño y construcción de magnetizadores para el estudio del efecto del campo magnético en el desarrollo de tejidos biológicos .Reporte Informa ISPJAM. Santiago de Cuba. (1994).
- Food and Drug Administration (FDA). Approval of new *Haemophilus influenzae* Type b conjugate vaccine and combined Diphtheria- Tetanus – Pertusis and *Haemophilus influenzae*. Tips conjugate vaccine for infants and children. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 42, 296-98 (1993).
- Fresno M., Kopf M., Rivas L. Cytokines and infectious diseases. **Immunology Today**. 18: 56-59 (1997).
- Fujioka N., Akazawa R., Uehara A., Fujie M., Ikada M., Karimoto M. Interleukin-18 protects against acute herpes- simple- virus type I. **Infect. J. Virol.** 73, 2401-04 (1999).
- Gabriele D., Wolf S., Inbo H. Cytokine and gene therapy. **Immunology Today**. 16 (14), 167-208 (1995).
- Galile V., Schelesinger M. The formation of stable E Rosette after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes. Sheep red blood cells. **J.Immunol** 112, 1628-34 (1994).
- Gaviñón J.V. Anticuerpos Monoclonales. Teoría y Práctica. Ediciones ELFOS. La Habana. 31-45 (1995).
- Gayton A. Tratado de Fisiología Médica. Séptima Edición. Edición Revolucionaria .128-30 (1989).
- Gerard G. M., Baudson N., Kraemer K., Bruck C., Garçon N., Paterson Y., Pan Z K., Pardoll D. Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations. **Vaccine** 19 (17-19), 2583-86 (2001).
- Glennie A.T., Pope C.G., Waddington H., Wallace U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **J. Pathol Bacteriol.** 29, 38-45 (1926).

- Glenin F.K. Radiation detection and measurement. Third Edition. Cap I. Radiation Sources 1-28. Editor New York Chichester. Weinheim Brishame Toronto Singapore. (1981).
- Goodman E.M, Greenebaum B., Marron M.T. Altered protein synthesis in a cell free system exposed to a sinusoidal magnetic field. *Biochem. Biophys. Acta.* 1202, 107-12 (1993).
- Goodman M., Greenebaum B., Marron M.T. Magnetic fields alter translation in *Escherichia coli*. *Electromagnetic.* 15, 77-83 (1994).
- Goodman E.M., Greenebaum B., Marron M.T. Effects of electromagnetic fields on molecules on cells. *Int REV Cytol.* 158, 279-338 (1995).
- Graeme C., Woodman B. New generation vaccines. Edited by Biotech. Australia Pty Ltd. Sidney. New South. Wales. Australia. (1990).
- Gray J. R., Erith C.H., Parker J.P. In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 28 (8), 575-83 (2000).
- Gupta R. K., Saxena S. N., Sharma R. B., Ahujas S. Comparative stabilities of glutaraldehyde heat inactivated pertussis. Vaccine components DPT. Vaccine with different preservatives. *Indian. J. Med. Res.* 95, 8-11 (1992).
- Gupta R. k., Bradford E., Relived E., Siber G. R. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds vaccine design. The subunit approach (MF Powell and MJ Newman eds) Plenum publishing Corporation new York. *J. Med. Res.* 229-48 (1995 a).
- Gupta R. k., Siber G. Adjuvants for Humans Vaccines. Currents Status. Problems and future prospects. *Vaccine.* 13 (14), 1263-65 (1995).
- Gupta R. k., Griffin P., Echenchang J. R., Rivera R., Anderson R., Rots B., Cecchini P., Nicholson M. The role of adjuvant and delivery. Systems in modulation of immune response to vaccine. Novel strategies in design and production of vaccines. Plenum Press. New York. *J. Immunol.* 105-13 (1996).
- Guy B., Nicole. , Fanon A., Bonnin A., Jimenez S., Lafay- Vialon E., Trannoy E., Haensler J. Design characterization and pre-clinical efficacy of a cationic lipid adjuvant for influenza Split Vaccine. *Vaccine.* 19, 1794- 1805 (2001).

- Hajto F., Hostanska K., Soller R. Mistetloe. Therapy from the pharmacology perspective. Forsh Komple Mentormed. *Vaccine*. 89-194 (1999).
- Harada S. I, Yamada S, kuramata O, Gunji Y, Kawasaki M, Miyakawa T, Yonekura H, Sukurai S., Bessho k., Asonó R., Yamamoto H. Effects of high ELF magnetic fields on enzyme catalysed DNA and RNA synthesis in vivo and on cell. Free DNA mismatch repair. *Bioelectromagnetics*. 22 (4), 260-66 (2001).
- Haubler M., Battersby S.T. , Mevissen M., Loscher W. Exposure of rats to 50 Hz 100 µTesla magnetic field does not affect the ex vivo production of interleukins by activated T or B lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 20 (5), 295-305 (1999).
- Hechavarria H. M. Evaluación de la Toxicidad a dosis repetida de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente. Trabajo de Diploma en opción al título de Ciencias Biológicas. Santiago de Cuba (1999).
- Helmy H. & Blomber M. T. Differential Immunoglobulin E and cytokine responses in Balb/c and C57B1/6 mice during repeated infections. With blood stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite Immunol* 22,185-190 (2000).
- Higashitani K., Oshitani J. Measurements of magnetic effects on electrolyte solutions by atomic force microscopy. Proceeding of the Second International Meeting on antiscala Magnetic Treatment. 14 Marth. Grandfield University Bedfordshire. England, (1996).
- Hyunock P., Gil SEO W., Suoh G.L., Layo S.M., Lee H., Suck H.L., Beam K.S., Chung H.T. Potentiation of Tumour Necrosis Factor  $\alpha$  induced apoptosis by Mistetloe- Lectin. *Immunopharmacol and Toxicol*. 22, 1697-709 (2000).
- Huang A.T., Elder M.E., Kinn J.A, & Ward T.R. The effect of microware radiation 2450 MHZ on the morphology and chromosomes of lymphocytes. *Radio Science*. 12. 173-77 (1977).
- Hunter R., Oshen, B. S. Adjuvant activity of non ionic block copolymers IV. Effect of molecular weight and formulation on titre and isotype of antibody. *Vaccine* 9, 250-58 (1991).

- ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time varying electric magnetic and electromagnetic field (Up to 300 GHz. *Healt Phys.* 74 (4), 494-522 (1998).
- IFFA CREDO. Products and Services .Catalogue. Edition 09.98. France. (1999).
- Infante J. F., Pérez P. S., Infantes L. Neisseria meningitides resultados experimentales sobre los biomodelos de rata y ratón. Monografía F.D. Finlay. (1996).
- Infante J. F., Pérez P., Caro f., Sierra G., Campa C. The hiperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA. MENINGOC BC against Neisseria meningitides group B. Clinical Isolated. *Achi of Medic. Research.* 28 (1), 55-60 (1997).
- Infante J. Evaluación fármaco toxicológica pre- clínica de la vacuna VA-MENINGO BC. Tesis Doctoral. Instituto Finlay. (2000).
- Ikeda K., Shinmura V., Mizoe H., Yoshida A., Sumitani H., Hasebe S., Matomura T., Yamacawa T., Mizuro F., Otaka y., Hirose H. No effects of extremely low frequency magnetic fields found on cytotoxic activities and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Bioelectromagnetics.* 24 (1), 21-31 (2003).
- Ivanov S.G. The magnetotherapy of hypertension patient's therapy. *Arku.* 62 (29), 71-74 (1990).
- Jarmila W., Miroslav F. Secretory and regulatory products of macrophages in the immune and inflammatory reactions. *Biol.* 48 (6), 709-17 (1993).
- Johson A.G., Gainss L. M. Studies on the O Antigen of *Salmonella typhosa*. Enhancement of antibody response to protein antigens by purified lipopolysaccharide. *J. Expe Med.* 103, 225-46 (1956).
- Kraasnow U.V., Shilenov A.J. Magnetotherapy of hepatitis A and B in children. *Pediatría.* 54-9 (1991).
- Kiho T., Shoes Y., Nargai K., Shigeo M. Polysaccharides in Fungi XXX. Antitumour and Immunomodulation activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chem.Fharm Bull.* 40, 2110-14 (1992).

- Kimber L., Dearman R. Cell and Molecular Biology of Chemicals. *Allergy and Immunol.* 15, 145-68 (1997).
- Klassem V. J. Magnetización de sistemas acuosos. Editorial Química. Moscú. Cap II. 22-8 (1982).
- Klein J., Hgejsi V. Immunology. Cap 4. Blood cells in vertebrate. Immunity. 41-45, and Cap 7. Cytokines Receptors. 294-300 Second Edition. England (1997).
- Koeter H. B. International harmonization of immunotoxicity testing OECD. *Human and Experimental Toxicol.* 14, 151-54 (1995).
- Larry A., Batelle P. Biological effects of EMF. What we know in 2003 from Annual Research. Bioelectromagnetics Society 25 Annual Meeting. Bioelectromagnetics Section. June (2003).
- Lebeque Y. Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. Trabajo de Diploma. Universidad de Oriente. Cuba. (1997).
- Le Moicnig P. Application to mana of vaccine, consisting of emulsions in fatty substances (lipids – Vaccines). *Comp Rend. Soc. Biol.* 29, 362-58. (1916).
- Lee J.E., Shens S., Karen A., Patrick J., Rodrey P.R. Developmental windows of differential lead induced immunotoxicity in chickens. *Toxicol.* 156 (239), 161-70 (2001)
- Limbland E. B. Aluminium adjuvants in Stewart Tull. DES Editor. The Theory and Practical Application of adjuvants. 21-35 (1995).
- Lindstron E., Lindstron P., Berglund A., Hasson M. L., Lundgren E. Intracelular calcium oscillations induced in a T cell line by a Weak 50 Hz magnetic field. *J. Cell Physiol.* 156, 395- 98 (1993).
- Livinstrong J.D. Un siglo de memorias magnética Investigación y Ciencia. 268, 64-69 (1999).
- López I. Conferencias de Inmunología. Parte I. Universidad de la Habana. Ediciones Revolucionarias (1981).
- Loscher W. Do carcinogenic effects of ELF elctromagnetic fields require repeated long- term interaction with carcinogens? Characteristics of positive

studies using the DMBA breast cancer model in rats. *Bioelectromagnetics*. 22 (8), 603-14 (2002).

- Lozano J. A., Galindo J. D., García J. C., Borron J. H., Martínez L. Bioquímica. MG GraW Hill. 3ra Edición Interamericana E.U. (1997).
- Luster M. I., Simeanova P. P., Golenci R., Matteson J. Tumour Necrosis Factor Alpha and Toxicology. *CRIT. REV. Toxicol.* 29, 491-511 (1999).
- McHugh R. S, Nagrajau S., Wang Y. E., Sell K. W., Salvaraj P. Protein Transfer of glucosyl phosphate dylinositol B7-1 into tumour cell membrane a novel approach to tumour immunoteraphy. *Cancer Res.*59, 2433-7 (1999).
- Mac Laughlin S., Poo P.M. The role of electroosmosisi in the electric field induced movement of changed macromolecules on surface of cell. *Biophys. J.*34, 85-93 (1981).
- Maercker K., Schlatterer R., Gminski R., schudenerN., Kuster F., Adlkofer R., Fitzner R., Tauber R. RF-EMF exposure increase protein synthesis in human promyelocytic cells. Bioelectromagnetics Society. 25 Annual Meeting. *Bioelectromagnetics*. Section. June (2003).
- Maestroni P., Clave, Skau S. Interleukin-18 contribute to host resistance and gamma Interferon production in mice infect with virulent *Salmonella thyphymurium*. *Infect Immunol.* 67, 478-80 (1999).
- Malmiuno J., Plonsey R. Bioelectromagnetism. Principles and applications of bioelectric and biomagnetism fields. Oxford. University Press. Oxford. (1995).
- Mandeville R., Ganco E., Sidrac S. G., Lourse P, N., Rocheleau N., Mercier G., Desy M.,Devaux C., Gabour L Evaluation of the potential promoting effect 60 Hz magnetic fields on N- ethyl- N- trysourea induced neurogenig tumor in female F344 rats. *Bioelectromagnetics*. 21, 84-93 (2000).
- Manni V., Antonella L., Pozzi P., Riete S., Serafino A., Giuliani., Grimaldi S. Effects of extremely low frequency (50 Hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes.*Bioelectromagnetics*. 23 (4), 298-305 (2002).
- Margni R. Inmunología e Inmunoquímica. Edición Revolucionaria. (1982).

- Massaki L. Effects of a homogeneous magnetic field on erythrocytes. Sedimentation and aggregation. *Bioelectromagnetics*. 18 (3), 215-22 (1997).
- Mary L., Queiroz S., Corselle Z. J., Fatima R., Pereira da Silva., Muller H., Giselle M.S., Gilman P. Stimulatory action of *Pucea quitoc*. Extract on haematopoietic response during murine listeriosis. *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* 22 (4), 721-40 (2000).
- Melius D. B. The role and function of Ethics Committees in the Unites States II. Curso sobre Biomodelos de Experimentación. Costa Rica. Meeting of the Stum (Montpelier France). 5, 5-9 (1997).
- Mengs V., Witthohn K., Schwartz, Lentzen H. Valma of Mistetloe of lectin standarized Mistetloe extract for evaluating antitumor properties wein. Med wochenship. *Vaccine*. 149, 262-4 (1999).
- Men Y. Inductions of substained and elevated Immune Response to weakly immunogenic, synthetic malarial peptides by encapsulation in biodegradable microspheres. *Vaccine*. 14 (15), 1242-50 (1995).
- Mevissen M., Haussler M., Szanel M., Enomendorffer A., Thumbattersby S., Loscher W. Complex effects on long-term 50 Hz magnetic field exposure in vive on immune functions in female Sprague-Dawley rats depend on duration of exposure. *Bioelectromagnetics*. 19 (4), 249-70 (1998).
- Michael G., Hanna J,R., Herbert C., Hoover Jrjam B., Vermoken., Jules., Harris H., Piredo M. Adjuvant active specific. Immunotherapy of stage II and stage III. Colon cancer with an autologous tumour cell Vaccine. First randomised Phase III trials show promise. *Vaccine*. 19, 2576-82 (2001).
- Miruslav V.C. Molecular mechanism of magnetic water treatment. Grandfield University USA. 14, 1-9 (1999).
- Mora C., Lomeli C. La nueva casa de animales de experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Revista informática de alta tecnología biomédica. *Animales de Experimentación*. 2 (2), 2-15 (1996).
- Moreim B., Begrgtssom K.L. Immunomodulatory by ISCOMs immunestimulating complexes. *Methods*. 19, 94-102 (1999).

- Moore A., McCarthy L., Mills K.K. The adjuvants combinations Monophosphoril Lipid A and QS-21 switches cell responses induces with a soluble recombinant HIV proteins from Th2 to Th1. *Vaccine*. 17, 2517-27 (1999).
- Morris H.J, Martínez C., Abdala R.T, Campos D. O. Adyuvantes Inmunológicos. *Rev. Cub. de Inv. Biom.* 18 (2), 130-7 (2000).
- Moulder J.E. Static and magnetic field and Cancer. FAQs. Introduction. *Electromagnetic Field and Human Health*. (1997).
- NC-98. Parámetros fisiológicos, químicos y hematológicos de la línea *Sprague Dawley*. CENPALAB. (1998).
- Negishi T., Imai S., Itabashi M., Nishimura I., Sasaro T. Studies of 50 Hz circulatory polarized magnetic fields of up to 350  $\mu$ T on reproduction and embryo-fetal development in rats. Exposure during organogénesis or during preimplantation. *Bioelectromagnetics*. 23(5), 369-89 (2002).
- Neil j., Sharimugan P., Nagjarow G., Bumgarner W., Silvary P. Development of therapeutic vaccines by direct modification of cell membranes from surgically removed human tumour tissue with immunoestimulatory molecules. *Vaccine*. 19 (15-16), 2029-38 (2001).
- Norma Española ISO10993-2. Parte 2. Requisitos relativos a la protección de los animales. Septiembre. (1998).
- Norma Española ISO 10993-11. Parte II. Evaluación Biológica de los productos sanitarios. Febrero. (1996).
- Norma Española ISO 10993-12. Parte II. Preparación de las muestras y materiales de referencia. marzo, 1998. Evaluación Biológica de los productos sanitarios. Febrero. (1996)
- O'Garra A. Interleukin in the Immune Systems. *Lancet*. 1, 943-6 (1989).

- O<sup>I</sup> Hagan O.T, Ott G.S., Van N. Recent advances, vaccine adjuvants the development of MF-29 emulsion and polymeric microparticles. *Molec Med Today*. 2, 69-75 (1997).
- O<sup>I</sup> Hagan O.T., Ugozzolio M., Bakackman J. Microparticles in MF-59 a protein adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1. *Vaccine*.18, 1793-801 (2000).
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidance for the testing of chemicals. *Guia 407* (1998).
- Orson F. M., Kinsey B.M., Hua P.J., Bhogal B.S., Densmore C.L., Barry M.A. Genetic immunization with lung-targeting macroaggregated polyethylenimine-albumin conjugates elicits combined systemic and mucosal immune response. *J. Immunol*. 164 (15), 6313-21 (2000).
- Ott G., Barchfeld .G. L., Van N. G. Enhancement of human influenza vaccine with the simple submission oil water emulsion adjuvant MF-59. *Vaccine*. 13(6), 1557-62 (1995).
- Ott G., Radhakrishman R., Fang J.H., Hora M. The adjuvant MF-59 a 10 year perspective in O<sup>I</sup> Hagan DT Editor. Methods in Molecular Medicine.Vaccine Adjuvants. Preparations Methods and Research Protocols. Totawa N. J. Humana Press INC. *Vaccine* 42, 221-28 (2000).
- Pallares S. D. Cardiología y Campos Electromagnéticos. II Jornada Internacional sobre Bioelectromagnetismo y Glándula Pineal. 53-61 (1992).
- Pallares S. D. Lo que he descubierto del tejido canceroso. Edit. Sodi Pallares. México DF. 58-78 (1998).
- Parsons S., Judd A., Sthepeson T., Udole S., Wang B. L. Magnetically augmented water treatment trans I *Chem.*. 98-104 (1997a).
- Parsons S., Hill P. Review of analytical methods used to asses. The influence of magnetic treatment. Grandfield University Magnetic treatment in static and flowing systems. *MAG 3*. 4(14), 1-20 (1999).
- Paul W. E. The Immune Systems. Fundamental Immunology. Third Edition. Roven Press. New York. 1-20 (1993).

- Pérez M. Fisiología Experimental, Ciudad Habana. Edición Revolucionaria. 56-65 (1986).
- Pessina G.P., Idinucci C., Palmi M., Sagaragli G., Benocci A., Meini A., Pessina F. Pulsed electromagnetic fields affects the intracellular calcium concentrations in human astrocytomas cells. *Bioelectromagnetics*. 22 (7), 503- 10 (2001).
- Petronyl G.C. The regulation of expression of histocompatibility antigens on the cell surface. Molecular Genetic Basic. *Folia Biológica (Praha)*. 4, 1163-77 (1995).
- Pissina P., Adinuci C. Short cycles of both static and pulsed electromagnetic fields have no effects on the induction of cytokines by peripheral blood mononuclear cells. *Bioelectromagnetics*. 18, 548-54 (1997).
- Picazo M.L., Vallejo D., Bardasano J.L. An introduction to the study of ELF magnetic field effects on white blood cell in mice. *Electro and Magnetobiol.* .31 (19), 77-84 (1994).
- Pico M.C., Giraldo I.G., Otero A. Inmunología Experimental. La Habana. Editorial Felix Varela (1997).
- Pierre J., Scheerlinck S. Genetic adjuvant for DNA Vaccines. *Vaccines*. 19, 2647-56 (2001).
- Pietrobon P.J. Liposome design and vaccine development in vaccine design. The subunit and adjuvant approach. Plenum Publishing Corporation. New York. *J. Immunol.* 347-61 (1995).
- Pizza M., Giuliani M.M., Fontana M.R., Monaci E., Douge G., Dougan G., Mills K., Rappuoli R., Giudice Del G. Mucosal vaccine no toxic derivates of LT and R.T. as mucosal adjuvants. *Vaccine*.19, 2534-41 (2000).
- Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine*.19, 2673-80 (2001).
- Polk C., Pastow E. CRC. Handbook of Biological. Effects of Electromagnetic fields. Boca de Ratón. CRC. Press II Edition. 103-47 (1986).

- Poo N.M., Robinson K.R. Electrophoresis of concavalin A receptor along embryonic muscle cell membrane. *Natur.* 265, 602-5 (1977).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 22 Determinación de proteínas totales. TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 25 Determinación de glucosa. TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 26 Determinación iones sodio. TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 27 Determinación iones potasio. TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 28 Determinación iones calcio. TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 20 Conteo total de leucocitos TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 21 Conteo diferencial de leucocitos TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 18 Determinación de Hemoglobina TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 19 Determinación de Hematocrito TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 36 Celularidad de médula ósea TOXIMED. (1998).
- Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT No. 37 Inmunocomplejos circulantes. TOXIMED. (1998).
- Rapacholi M., Grecnebaum A. Interaction of static and extremaly low frequency electric and magnetic fields with living systems. Healt effects and research need. *Bioelectromanetics.* 20, 133-60 (1999).
- Rapaccholi M. Biological effects of EMF. Results from WHOS EMF. Protect. Boelectromagnetics Society. 25 Annual Meeting, *Bioelectromagnetics* Section. June. (2003).

- Reid K., Father M. Humoral immunological response in females albino rats during rotating (magnetic field) exposure. *Internat. J. Biol.* 34 (4), 239-41 (1991).
- Remisov A. Física Médica Biológica Editorial MIR. Moscú. Cap III, 45-78 (1987)
- Richard R.L., Riad M., Wassef U.M., Glennh. Rolwel S.W., Alving C.R. Liposoma containing Lipid A. Since as and adjuvant for induction on antibody and cytotoxic T cell response against. RTS malaria antigen. *Infect. Immunol.* 66 (6), 2859-65 (1998).
- Rodríguez B., Correa M., Hurtado A. Efectos del tratamiento Magnético del agua y soluciones acuosas. *Rev Cub. de Quím.* 10, 1-2 (1998).
- Roitt I. Immunología Esencial. Edición española. Barcelona. España. (1998).
- Rojas H.A., Abraham O., De la Fuente R., Campos V., Leal G.C., Rodríguez F.L., Fuente C.B. Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes in vitro Sister – chromatic exchanges, cell kinetics and mitotic rate. *Bioelectromagnetics.* 22 (3), 145-49 (2001).
- Salager J.L. Formulation concepts for the emulsion in Nielloud F Mestres GM editors, Pharmaceuticals Emulsions and Suspensions, Pharmaceuticals *Scien.* 105, 19-68 (2000)
- Salgaller M.L., Ladge P.A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. *J.Sup Oncol.* 68 (2), 122-38 (1998).
- Sánchez M.C. Análisis de los efectos de los campos electromagnéticos de 50 Hz mediante el ensayo de micronúcleos, Universidad de Alcalá (U. A.). Tesis Doctoral. (1996).
- Sans Cemento M.P. Variaciones hematológicas en ratones sometidos a la influencia de campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja. Universidad de Alcalá. (U.A) Tesina (1995).
- Santos W., y col. Ensayos para evaluar algunos efectos biológicos de la sustancia CM.95 Tratada Magnéticamente. Trabajo de Diploma. Santiago de Cuba. (1997).

- Salvatore J., Harrington R., Savid T., Kument C.T, Hayden V.A. Static magnetic field in the clinical treatment of human malignancy. *Bioelectromagnetics Society. 25 Annual Meeting Section June (2003)*.
- Sciorsci R.L., Bianchi P., Minoia P. High levels of endorphin and related pathologies of veterinary concern. A review. **Immunopharmacol. and Immunotoxicol.** 22 (4), 575-676 (2000).
- Selena G., Pérez R., Martínez L., Arias A., Coimbra M., Sánchez Y. Cultura de calidad y acreditación de laboratorios de ensayos toxicológicos. Toxicología Regulatoria. X Congreso Latinoamericano de Toxicología. Palacio de las Convenciones. 24-27 Nov. Libro Resumen.187 (1998).
- Selgrade M.K. Immunotoxicology. Bridging the gap between animal research and human health effects. *Fund. And Applied Toxicol.* 24, 13-21 (1995).
- Selmaoui B., Bogdan A., Auzéby A., Lambrazo J., Touitou Y. Acute exposure to 50 Hz magnetic field does not affect haematological of immunology functions in healthy young men. A circadian study. *Bioelectromagnetics.* 17 (5), 364- 72 (1996).
- Sensi M.L., Camacoli F. Clonal expansion of T lymphocyte in human melanoma metastasis after treatment with hapten- modified autologous tumours vaccine. *J Clin Invest.* 99, 710-17 (1997).
- Seze de R., Bouthel C., Tuffe T.S., Peschau V.P., Caristan A., Morean I.M., Veyret B. Effect of time varying uniform magnetic field on NK cell activity and antibody response in mice. *Bioelectromagnetics.* 14, 405-11 (1993).
- Sherry D., Fleming A., Priscilla A., Campbell P. Macrophages have cell surface IL-10 that regulates macrophages bactericidal activity. Copyright. The American Association of Immunologist. *J. Immunol.* 1144-50 (1996).
- Shung T.k., Shing L.Y., Chang C., Hitch M.D., Yangting F., Wang. J.G. Immunomodulation of Bu-Zhong-Yiqi-Tang on in vitro Granulocyte Colony Stimulatory Factor and Tumour Necrosis Factor  $\alpha$  production by peripheral blood mononuclear cell. *Immunopharmacol and Toxicol.* 22 (4), 710-20 (2000).

- Siber G.R. Pneumococcal disease prospect for a new generation of vaccine. *Science*. 265, 1385-87 (1994).
- Sierra G., Campa C., García L., Sotolongo P., Izquierdo P. y col. Neisseriae.1990. Efficiency evaluation of the cuban Vaccine VA- MENGOC-BC against disease caused by serogroup B Neiseria meningitidis in Editors Achtman. Kolh. Marchal.Morelli. Seiter Thiesen. Walter de Grayter. Berlin. New York. 1991
- Sierra G., Campa C., Varcárcel M. y col., Vaccine against Group B. Neisseria meningitidis; Protection trial and Mass. Vaccination Result in Cuba. **NIPH. Ann.** 14(2), 1991
- Simko M., Lupke H., Roeluitz J. Cell activation process induced by 50 Hz electromagnetic field. Bioelectromagnetics Society. 25 Annual Meeting. *Bioelectromagnetics* Section. June. (2003).
- Szatmary Z. Tumour Necrosis Factor Alpha molecular biological aspects. Mini review. *Neoplasm* .46, 257-66 (2000).
- Silla S., Fallari F., Boan T., Uyttenhave C. Enhancement by IL-12 of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response of mice immunized with tumour specific peptides in an adjuvants containing QS-21 and MPL. *Eur Cytokine New*.10, 181-90 (1999).
- Sjolander A., Debbie D., Maraskauski E., Schier J.O., Suhrier A., Tennent T.J., Pearse M. Immune response to ISCOM formulation in animal and primate models. *Vaccine*.19, 2661-65 (2001).
- Smith O. Cell stress and EMFs. *Natur. Med.* 2, 22-25 (1996).
- Sotang W. Modulation of cytokine production by interferential current in differentiated HL- 60 cells.*Bioelctromagnetics* 21 (3), 238- 44 (2000).
- Sotolongo F. *Neisseria meningitides*. Aspectos bacteriológicos e inmunológicos. Serie Monografía FD. Finlay. (1996).

- Soto Y., Román M., Tighe H., Leu D., Corr M., Nguyen M.O., Silverman G. J., Lotz Mcorson D.A., Raz E. Immunoestimulatory bacterial DNA, Sequences activated dendritic cells and promote priming and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunology*. 99 (1), 1-7 (2000).
- Stange B.C., Rowland R.E., Rapley B.I., Poold J.V. ELF magnetic fields increase amino acid uptake into *Vicia faba* L. Roots and alter ion movement across the plasma membrane. *Bioelectromagnetics*. 27 (5), 347- 54 (2002).
- Stewart T.D. Recommendation for the assessment of adjuvants. (Immunopotentiator). In *Immunological Adjuvants*. Gegoriadis G., Allison A.C., Poste G. *Immunological Adjutants and Vaccines*, New York. Plenum Press. 213-26 (1989).



- Stewart T.D. Freund type mineral oil adjuvants emulsions in Stewart Tull Des editor. *The Theory and Practical Application of Adjuvants*.1-19 (1995).
- Stites D.P., Stogo J.D., Fuderberg U.H., Wule V.J. *Inmunología Básica y Clínica*. Editorial Científico Técnica. 200-250 (1985).
- Sugawara I., Yamada H., Camello H., Misumo Stakida R., Akiras S. Role of IL-18 in mycobacterial infection in gene disrupted in mice. **Infect Immunol.** 67, 2585-88 (1999).
- Takidat T., Sutsoi H., Yahismoto J. Detective NK cell activity and the response IL-18 deficient mice. **Immunity.** 8, 383-86 (1998).
- Tascon R.E, Ragno S., Lowrise D.B., Colston M.J. Immunoestimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation CD8<sup>+</sup> T cells. **Immunol.** 99, 1-7 (2000).
- TaKx K B.C. Immunomodulators. Future prospects. *Pharmacology.* **Weerbi Sci.**14, 24-52 (1992).
- Tegerday R.P., Lacetera N.C. Vitamin E. adjuvants formulations in mice. **Vaccine.**: 204-06 (1991)
- Theriforde T.S., Shifrine M. Assessment of the immune responsiveness of mice exposed to a 1-5 T stationary magnetic field. **Bioelectromagnetics.** 5, 443-46 (1984).
- Thomas J., Orazio D., Niederkon J.Y. A novel role for TGF- $\beta$  and IL-10 in the induction on immune privilege. **J. Immunol.** 2099-91 (1998).
- Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., Marsden R., Beck L., Corbiel J., Richman D., Eidem J.J., Spregelberg H.L., Raz E. Conjugation of protein to immunoestimulatory DNA results in a rapid long-lasting and potent induction of cell mediated and humoral immunity. **Eur. J.Immunol.**30 (87), 1939-47 (2000).
- Tofani S., Cintonino M., Barone D., Barandelli M., Margherita M., Santi D., Ferrera A., Orlassino R., Osola P., Rolfo K., Roncheto F., Tripodi A.S., Tosy P. Increased mouse survival; tumour growth inhibition and decreased

immunoreactive p 53 after exposure to magnetic fields. **Bioelectromagnetics** 23 (3), 230-38 (2002).

- Tum P.H. Coadyuvantes inmunológicos y Coestimulación. Noticias Médico Veterinaria. 59 (1), 88-93 (1988).
- Van L. Immunotoxicological considerations. A practical approach to immunotoxicity, testing in the rat in Dayan et al. Advances in Applied Toxicology. London Taylor and Francis.143-65 (1989).
- Vanselón B.A. La aplicación de adyuvantes a la Medicina Veterinaria. Veterinary Bulletin. 37 (11), 881-93 (1989).
- Verheyen G.R., Rawwels G., Verschaeve L., Schoeters G. Effects of co exposure to 50 Hz magnetic fields on aneugen on human lymphocytes determined by the cytokinesis black micronucleus assay. **Bioelectromagnetics**. 24 (3), 160-64 (2003).
- Vermoken J. B., Claessen A. M., Van Titeren H., Gall H. E., Ensega R., Meifer S., Scheper R.J.,Meijer C., Bloema E., Rauson J. H., Hanna M.G., Pinedo H.M. Active specific immunotherapy for stage II and Stage III human colon cáncer a randomised Trial. **Lancet**. 353, 45-50 (1999).
- Viltre R. Estudio de la solubilidad de algunos nitratos en ATM a 30 °C . **Rev. Cub. de Quím.** 11,31-35 (1999).
- Vohr H.W. Experiences and advances screening procedure for the identification of chemicals with and immunotoxic potential in routine toxicology. **Toxicol.** 104, 149-58 (1995)
- WaJ Y., Gardner B. H., Murphy C. I., Seals J. R., Kensil C. R., Recchia J., Beltz G. A., Newman M. J. Saponin adjuvants enhancement of antigen specific immune response to an experimental HIV-1 Vaccine. **J. Immunol.** 148, 1519-25 (1992).
- Walleczck J., Budinger T.F. Pulsed magnetic field effects on calcium signalim in Lymphocytes dependence on cell static and field intensity. **FEBS Lett.** 314, 351-55 (1992).

- Widera G., Austin M., Rabussay D., Goldbeck C., Barnett S.W., Chen M., Leung .L., Otten G.R., Thudium K., Selby H.J., Ulmer J.B. Increased DNA vaccine delivering and immunogenicity by electroporación in vivo. **J. Immunol.** 164 (9), 4635-40 (2000).
- Yin M., Thomasin C., Merkle P. H., Gander B., Corradin G. A simple administration of Tetanus Toxoid in biodegradable microspheres elicits T cells and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminium hydroxide. **Vaccine.** 13 (7), 683-89 (1995).
- Yost M.G., Liburdy R. P. Time varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transductions in the lymphocyte. **FEBS. Lev.** 296, 117-22 (1992).
- Zhadin M. N. Review of Russian literature on biological action of DC and low frequency AC magnetic field. **Bioelectromagnetics.** 22 (1), 27-47 (2001).
- Zubari S., Sthepharie L., Sue H., Paul M. Immunoterapia con OX4OL- FC o Anti CTLA-4 levanta respuesta local y mata a *Leishmania donovani*. Kaye Publisher Online. **Eur. J. Immunol.** 34 (5), 1433-40 (2004).
- Zubina L. V. Effectiveness of Magnetotherapy in optic never atrophy a preliminary Study Vestr. **Oftalmol** 82 (9), 54-77 (1990).

## **Anexo I**

## **Efectos Físicos y Químicos- Físicos del campo magnético**

Desde la década de los 40 se han estudiado con mayor sistematicidad los posibles efectos físico-químico de los campos magnéticos en diferentes sistemas, registrándose los resultados principales en sistemas acuosos tratados magnéticamente (Klassem, 1982). En este caso, los cambios en las propiedades de la fase líquida homogénea son a menudo muy pequeños, pero no por esto imposibilitan la obtención de efectos terminales considerables, lo que se puede explicar por la producción y estabilización de pequeños cambios primarios en las propiedades de esos sistemas, seguido por mecanismos intermedios que aumentan estos cambios. Bardasano (2000) señaló que las interacciones del campo magnético con la materia a nivel molecular podían ser debido a reorientación de moléculas, de radicales libres, cambios conformacionales y movimiento de iones bajo la acción de la fuerza del campo magnético.

Estudios moleculares recientes (Colic y col., 1999; Miruslav y col., 1999) dan a conocer algunos mecanismos que podrían explicar los cambios en las propiedades físico-químicas que sufre el agua u otras soluciones acuosas después de su tratamiento magnético, encontrándose que se puede perturbar la interfase gas/líquido y consecuentemente modificar las interacciones de las moléculas de agua con iones disueltos y coloides suspendidos. Por otro lado, Barrett y col. (1999) plantearon que las principales modificaciones que se observan en el agua tratada magnéticamente ocurren en las propiedades de hidratación de los materiales inorgánicos y en su reactividad química, lo que no contradice las hipótesis planteadas en años anteriores por otros científicos.

Alfeng recibió en 1970 el Premio Nobel de Física al demostrar que un campo magnético altera la naturaleza del movimiento de partículas cargadas (electrones e iones), las partículas cargadas se mueven en un plano perpendicular al campo magnético y de forma circular, aumentando el radio de acción con la masa de la partícula y con su energía térmica, pero decreciendo con el aumento de la intensidad del campo magnético (Barrett y col., 1999).

Hipótesis basadas en la acción de los campos magnéticos sobre iones presentes en las soluciones acuosas, plantean que el campo magnético interactúa con los iones presentes en las corrientes de agua que se desplazan a través de él. Los iones no son más que

átomos que tienen la particularidad de poseer carga eléctrica positiva o negativa; el campo magnético produce una fuerza magnética que recae sobre los iones en movimiento, presentes en dicha solución. Algunos trabajos plantean que al producirse esta fuerza, los iones comienzan a moverse alrededor de las líneas de fuerza del campo con determinada velocidad, adquiriendo un movimiento iónico en torno a una posición media, favoreciendo la posibilidad de aumentar la interacción entre cationes y aniones como consecuencia de la disminución de la distancia entre ellos, lo que está en concordancia con la teoría de choque de Arrhenius (Santos, 1998). Según esta teoría, la probabilidad de asociación entre iones es proporcional a su aproximación y al tiempo de permanencia uno cerca del otro.

Baker y col. (1996) afirmaron que el tratamiento magnético del agua y de soluciones acuosas de laboratorio tiene influencia en sus propiedades físico-químicas al producir aumento de la cristalización, tensión superficial y viscosidad entre otras propiedades. Rodríguez y col. (1998) evaluaron los efectos del tratamiento magnético sobre soluciones de NaCl, observando un aumento de la tensión superficial del agua y de otras sales. Viltre y col. (1999) obtuvieron un aumento de la solubilidad de nitratos en soluciones acuosas tratadas magnéticamente. Parsons y col. (1997, 1999) observaron cambios físico-químicos en el agua tratada magnéticamente así como en soluciones de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), encontrando en esta última un cambio en el pH. Wang y col. (1999) detectaron un proceso rápido de cristalización en las soluciones de  $\text{CaCO}_3$ , resultados que fueron reportados por Barrett y col. (1999).

Estudios moleculares recientes (Miruslav y col., 1999) dan a conocer algunos mecanismos que podrían explicar los cambios en las propiedades físicas o físico-químicas que sufre el agua u otras soluciones acuosas después de su tratamiento magnético, encontrándose que se puede perturbar la interfase gas/líquido y consecuentemente modificar las interacciones de las moléculas de agua con iones disueltos y coloides suspendidos.

En la Tabla I-1 se muestran las variaciones de algunas magnitudes físicas reportadas por diferentes autores (Rodríguez y col., 1998; Viltre y col., 1999; Parsons y col., 1999; Miruslav y col., 1999). Esta tabla revela que la mayor influencia del campo magnético es en la tensión superficial, la que varió significativamente en la Solución tratada

magnéticamente con respecto a la no tratada y aumentó con la inducción magnética y velocidad de flujo, según Rodríguez y col., 1998. El cambio en la tensión superficial de las soluciones tratadas magnéticamente trae consigo que estas se hagan humectantes y por ende penetren muy fácilmente en las células y los tejidos (Bardasano, 2000).

Tabla I-1 Efectos del tratamiento magnético aplicado a la Solución de sales en diferentes inducciones magnéticas y velocidades de flujo mediante el comportamiento de los valores medios de diferentes parámetros físico-químicos en la misma.

Parámetros	Solución sin tratar magnéticamente	Solución tratada magnéticamente			
		B = 0,03 T y V = 1,0 m/s	B = 0,13 T y V = 1,0 m/s	B = 0,03 T) y V = 1,5 m/s	B = 0,13 T y V = 1,5 m/s
N = 10					
Densidad (g/mL)	$3,2684 \pm 4 \times 10^{-4}$	$3,2684 \pm 4 \times 10^{-4}$	$3,2684 \pm 4 \times 10^{-4}$	$3,2684 \pm 4 \times 10^{-4}$	$3,2684 \pm 4 \times 10^{-4}$
Viscosidad (Pa s)	$5,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$
Índice de refracción	$1,3366 \pm 2 \times 10^{-4}$	$1,3366 \pm 2 \times 10^{-4}$	$1,3366 \pm 2 \times 10^{-4}$	$1,3366 \pm 2 \times 10^{-4}$	$1,3366 \pm 2 \times 10^{-4}$
pH	5,92	5,92	5,91	5,90	5,92
Absorbancia DO (378 nm)	$0,083 \pm 5 \times 10^{-5}$	$0,081 \pm 5 \times 10^{-5}$	$0,080 \pm 5 \times 10^{-5}$	$0,082 \pm 5 \times 10^{-5}$	$0,081 \pm 5 \times 10^{-5}$
DO (528 nm)	0,065	0,061	0,061	0,061	0,061
Tensión Superficial (N/m)	$0,07425 \pm 4 \times 10^{-4}$	$0,07439 \pm 4 \times 10^{-4}$	$0,07443 \pm 4 \times 10^{-4}$	$0,07448 \pm 4 \times 10^{-4}$	$0,07449 \pm 4 \times 10^{-4}$

## **Anexo II**

## Efectos del tratamiento magnético a CM-95 en el tiempo

En la figura II-1 se muestra el efecto postratamiento de la Solución CM-95, inoculada en ratones Balb/c a diferentes tiempos de su tratamiento magnético, a través del comportamiento de macrófagos peritoneales. Esta figura revela que después de tratada la Solución CM-95, la duración del efecto de tratamiento magnético incrementa con el aumento de la inducción magnética. En el caso de GTM2 el efecto duró 150 minutos, mientras que para el GTM4 esta fue superior a los 180 minutos (aproximadamente 240 minutos por interpolación de datos), a partir de estos tiempos no se encontraron diferencias significativas con respecto al GCN y GSTM.

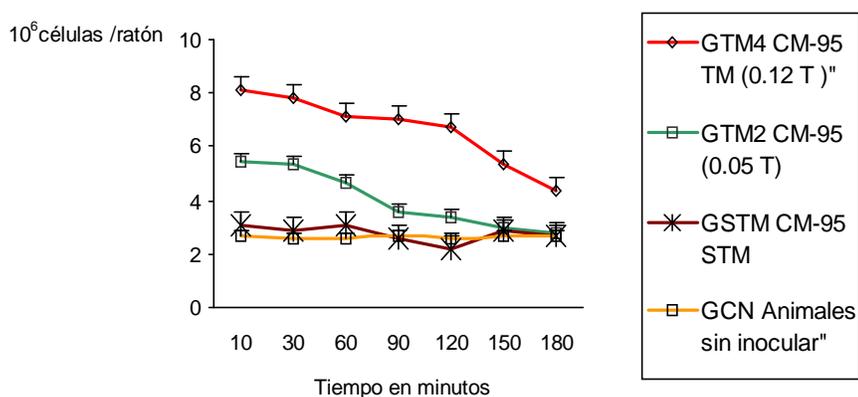


Figura II-1. Efectos de la Solución CM-95 sobre macrófagos peritoneales de ratones Balb/c inoculada a diferentes tiempos de su tratamiento magnético. El grupo GTM4 mantuvo efectos hasta tiempos superiores a 180 minutos y el GTM2 hasta los 150 minutos.

Estos son los tiempos para los cuales la Solución CM-95 TM conserva su memoria magnética, es decir es el tiempo que transcurre desde que la dicha Solución ha sido excitada por la acción del campo magnético estático, hasta que retorna a su estado inicial antes del tratamiento. Durante el tiempo que se mantuvo excitada la Solución CM-95 tratada magnéticamente para los dos valores de inducción magnética, se observó que el número de macrófagos fue significativamente mayor  $P < 0,05$  al de GSTM y GCN, y más acentuado para el GTM4 el que presentó diferencias significativas con todos los grupos  $P < 0,05$ . No se encontraron diferencias significativas entre el GSTM y GCN.

Las diferencias significativas encontrada dentro de los grupos tratados respecto a las de sus respectivos controles, pudieran ser explicadas porque la acción del campo magnético estático, puede inducir cambios en las propiedades físico-químicas de la Solución

CM-95, las cuales dependen de la fuerza magnética que ejerce el campo magnético sobre la Solución CM-95. Esta fuerza depende de la susceptibilidad y volumen de la Solución, de la inducción magnética y del gradiente de campo magnético. De estos parámetros, solo la inducción magnética varió, manteniéndose constante el resto de los parámetros en los experimentos desarrollados. Este hecho explica el por qué las diferencias encontradas entre los grupos tratados.

Los cambios mencionados en CM-95, pudieran ser debido a interacciones del campo magnético estático con los iones en la Solución y/o a la reorientación de los momentos magnéticos de la misma, que pudieran ser la causa posible de los cambios en su tensión superficial previamente reportada por Rodríguez y col., 1998 y en diferentes sales tratadas con un CME por Viltre et al., 1999.

## **II.2 Memoria magnética en el tiempo de CM-95 TM e inoculada en ratones Balb/c en una y dos dosis**

La figura II.2 muestra la memoria magnética adquirida de la Solución CM-95 tratada magnéticamente con una sola dosis de inducción magnética en  $t = 0$  minutos e inoculada en ratones Balb/c, a través del comportamiento de macrófagos peritoneales. En esta figura se observa que la duración de la memoria magnética de la Solución CM-95 tratada con un solo estímulo de inducción magnética (día cero) fue superior a 360 minutos. Un hecho interesante que se destaca en esta figura es el incremento significativo del número de macrófagos peritoneales en el GTM4 después de los 180 minutos, con respecto a GSTM y GCN, cuando la conducta esperada debía ser la disminución de este número hasta tender al de estos grupos. Se encontraron diferencias significativas en el número de macrófagos peritoneales en el GTM4 con respecto al de GSTM y GCN, excepto a los 180 minutos con el GSTM ( $P < 0,05$ ); entre los grupos controles no se encontraron diferencias significativa hasta los 180 minutos. A partir de este tiempo el número de macrófagos peritoneales en el GSTM incrementó significativamente en comparación con el de GCN.

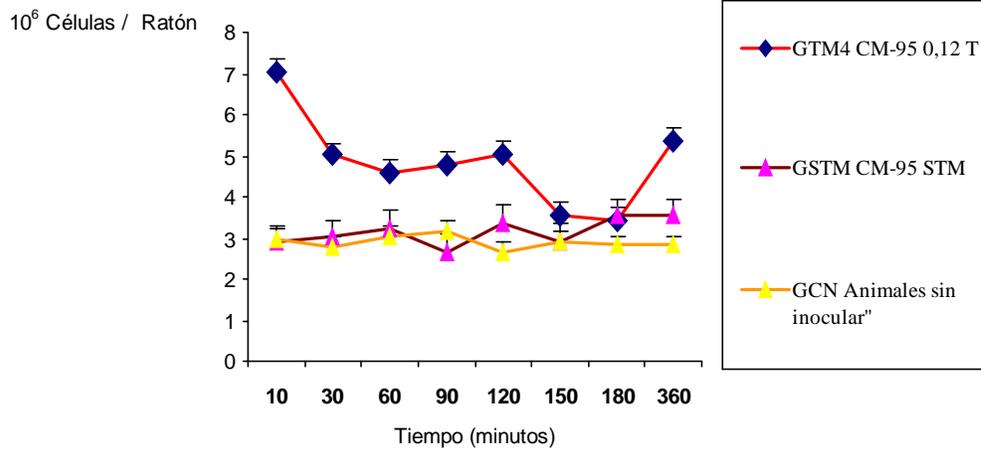


Figura II-2 Efectos de la Solución CM-95 TM sobre macrófagos peritoneales inoculada en dosis única en ratones Balb/c una vez tratada a diferentes tiempos de su inoculación. El GTM4 presento valores superiores a los controles en todos lo tiempos.

También se corroboró que la duración de la memoria magnética de CM-95 es superior a 360 minutos a través de la actividad de la enzima lisosomal fosfatasa ácida, según se indica en la figura II.3. En esta figura se muestra un incremento significativo en este parámetro para el grupo GTM4 con respecto al de GSTM y GCN ( $P < 0,05$ ), pero no así entre estos dos grupos controles. Otro hecho importante a destacar es el aumento de la enzima lisosomal en GTM4 después de los 180 minutos, cuando el comportamiento esperado era que el valor de este parámetro tienda al del GSTM y GCN.

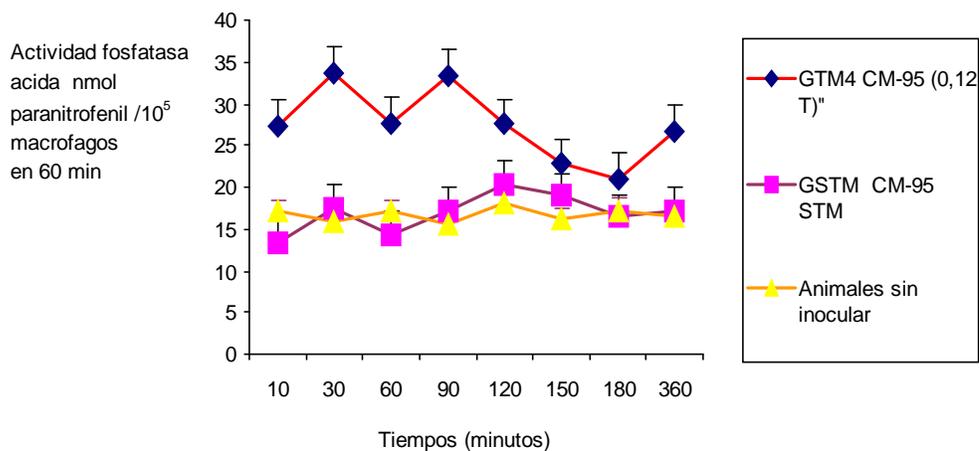


Figura II-3 Efectos de la Solución CM-95 TM sobre la fosfatasa ácida lisosomal en dosis única en ratones Balb/c una vez tratada a diferentes tiempos de su inoculación. EL GTM4 estimuló la actividad de esta enzima con valores superiores a los controles

En las figuras II.4 y II.5 se muestran el efecto de memoria magnética de la Solución CM-95 cuando fue tratada magnéticamente con la misma dosis  $t = 0$  minutos y 120 minutos; a través del número de macrófagos peritoneales y el comportamiento de la enzima fosfatasa ácida lisosomal, respectivamente. Estas figuras indican la potenciación de estos parámetros en el GTM4 en comparación con aquellos obtenidos en el mismo grupo, correspondiente a CM-95 TM con una sola dosis  $t = 0$  minutos, mostradas en las figuras II.2 y II.3.

Las figuras II.4 y II.5 muestran que el uso de dosis repetitivas de CM-95 TM, en dos instantes de tiempo, incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) la duración del efecto memoria en la Solución (por encima de 480 minutos), con respecto a la de una sola dosis. En estas dos figuras también se destaca el hecho que después de los 240 minutos en GTM4 hubo un incremento en ambos parámetros, cuando la conducta esperada era una disminución en ellos, hasta tender a los valores correspondientes de sus respectivos grupos controles. En el GTM4 para estos dos parámetros se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles  $P < 0,05$ . La figura II.4 revela el incremento significativo en el número de macrófagos peritoneales para el GSTM con respecto al del GCN a partir de los 180 minutos de la primera inoculación. También en el GSTM se observó un incremento significativo en la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal ( $P < 0,05$ ) en comparación con la del GCN en el intervalo de tiempo de 180 a 240 minutos.

Los posibles cambios inducidos en la Solución CM-95 TM pudieran explicar su efecto memoria medido indirectamente a través el número de macrófagos peritoneales y de la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal. Este efecto memoria es dependiente de la inducción magnética, del número de veces que se repite la dosis de inoculación de la Solución CM-95 TM en los ratones.

La memoria magnética adquirida por la Solución CM-95 TM alcanzó valores elevados cuando se inoculó en  $t = 0$  y a los 120 minutos, a través de los parámetros evaluados, posiblemente porque indujo cambios más acentuados sobre las células que la recibieron y por ende un mayor retardo en el tiempo que transcurre desde que dicha solución ha sido excitada hasta que tiende al estado de la misma cuando no es tratada magnéticamente.

Los efectos del CEM sobre CM-95, pudieran ocasionar cambios conformacionales reversibles sobre la misma, o sea, cambios cíclicos de su estado físico que conducen a una mayor interacción de esta Solución con las cargas eléctricas y los canales iónicos presentes en la membrana de las células, así como cambios en la permeabilidad de estas. Estos cambios conformacionales se hacen más acentuados con el aumento de la inducción magnética, lo que pudiera explicar los cambios significativos obtenidos en el número de macrófagos peritoneales y la activación de la enzima fosfatasa ácida lisosomal para el mayor valor de inducción magnética usado.

Existe una diversidad amplia de teorías que explican la existencia de estos cambios conformacionales, tales como: 1) cambios en la estructura del agua y de las soluciones acuosas. Aquí se supone que el campo magnético afecta los enlaces por puente de hidrógeno debido a cambios reportados en las propiedades del agua tales como absorbancia de la luz, tensión superficial y pH. 2) el tiempo de relajación de estos enlaces es muy rápido y la intensidad del campo magnético muy pequeña para tales efectos, 3) la energía de enlace por puente de hidrógeno entre las moléculas de agua (25 kJ/mol) es aproximadamente 23 veces mayor que la suministrada al agua durante un tratamiento magnético con una inducción de 0,1T, la cual alcanza 0,105 kJ/mol, apenas suficiente para cambiar la temperatura del agua tratada magnéticamente en 1 °C, 4) el cambio en la orientación de los espines nucleares de los átomos de hidrógeno en la molécula de agua. Los espines de los núcleos de dos átomos pueden estar orientados en un sentido (*orto* - hidrógeno) o en sentido contrario (*para* - hidrógeno). Como resultado de la acción del campo magnético la relajación metaestable entre las cantidades de modificaciones *orto* y *para* existente en la molécula de agua se altera. La energía necesaria para el uso de una a otra es de ciento de veces menor que la energía requerida para la ruptura de los enlaces por puente de hidrógeno y es por eso que el agua puede reaccionar a las más débiles reacciones de campo magnético externo, 5) un incremento de la nucleación en el seno de la solución. Sin embargo, científicos europeos, sobre la base actual de la teoría de cristalización, han concluido que cualquier efecto sobre la nucleación heterogénea tendría un tiempo de relajación de nanosegundos y que sería improbable algún efecto sobre la nucleación homogénea aún después de la exposición a un campo relativamente fuerte (0,5 T) [Miruslav y col., 1999].

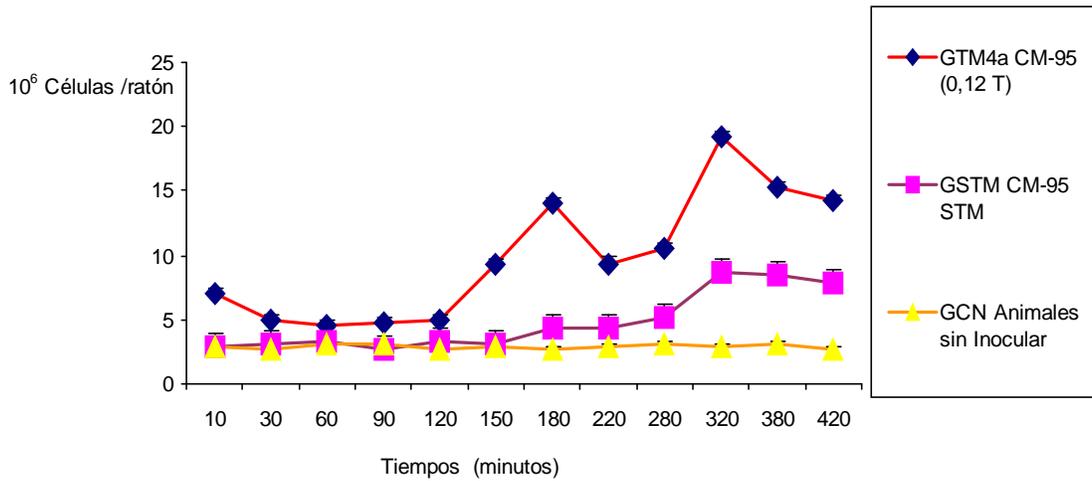


Figura II-4 Efectos de la Solución CM-95 TM sobre macrófagos peritoneales en dos dosis a diferentes tiempos de inoculada en ratones Balb/c. El GTM4 aumentó sus efectos en el tiempo con respecto a los controles.

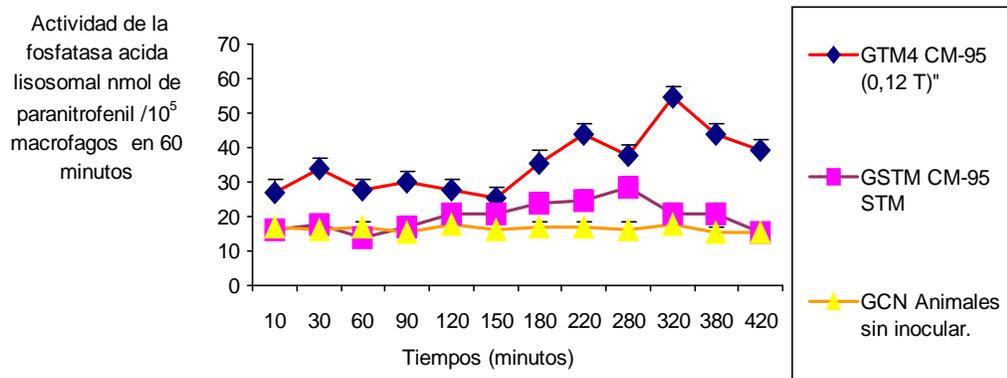


Figura II-5 Efectos de la Solución CM-95 TM sobre la Fosfatasa ácida lisosomal en dos dosis a diferentes tiempos de inoculada en ratones Balb/c. El GTM4 duplicó y mantuvo sus efectos en el tiempo respecto a los controles.

## **Anexo III**

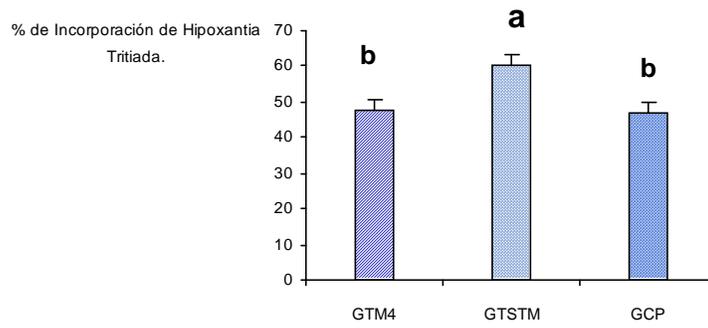


Figura III-1 Incorporación de Hipoxantina Tritiada en glóbulos rojos de ratones NMRI infectados con 10% de de *P. chabaudi* (P-130) tratados con CM-95 TM. El GTM4 (CM-95 TM) inhibió el Parasito similar a la Cloroquina (GCP) in vitro

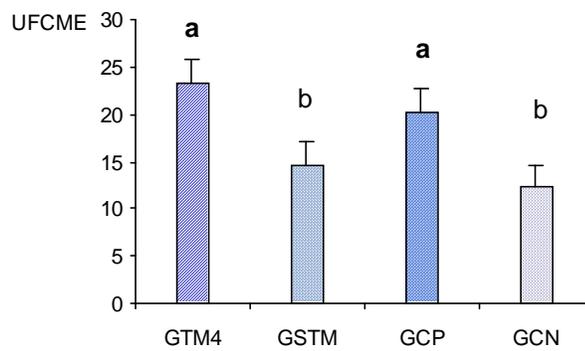


Figura III.2 Unidades formadoras de colonias macroscópicas endógenas en bazo de ratones Balb/c inoculados por vía I.P. en un esquema de cinco días con tres inoculaciones. GTM4 (CM-95 TM) con valores similares al GCP (BCG).

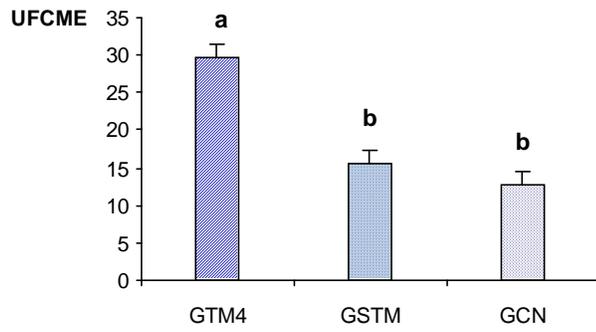


Figura III.3 Unidades formadoras de colonias macrosópicas endógenas en ratones Balb/c inoculados por vía I.P. con dos dosis de CM-95 TM.GTM4 ( CM-95 TM )con valores superiores a los controles (GSTM y GCN ).

## BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

- **Martínez CE**, Infante J., Sierra G., Delgado L., Cobas G., et al. Evaluación de la Sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos particulados en ratones Balb/c por vía Intraperitoneal.: Vaccimonitor 1999, 8 (11):2-6.
- Morris H., **Martínez C.E**, Abdala R., Campos D. Adyuvantes inmunológicos. Revista Cubana de Investigación Biomédica 1999; 18(2):130-7.
- **Martínez CE**, Cobas G., Lebeque Y., Fontaine R, Pérez I, Almenares J, Morris H. Evaluación de la Sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos de Pseudomonas aeruginosa. Biotecnología Aplicada. 2003; 20: 22-25.
- **Martínez C.E.**, Pérez I., Fontaine R., Morris H. Efectos de la Solución salina CM-95 tratada magnéticamente en calidad de adyuvante inmunológico para la obtención de un suero somático antibacteriano en Conejos Nueva Zelandia Blancos. Animales de Experimentación 2003, 6(3). (Aceptado a publicar).
- **Martínez C.E.**, Pérez I., Fontaine R., Morris H. Efectos de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente sobre células mononucleares humanas y de ratone Balb/c. Revista Biotecnología Aplicada, Entregado a publicar 2004 (en proceso de arbitraje).
- **Martínez C.E.**, Pérez I.P., Santos W., Sierra G.G., Morris H.Q., Tamayo V.O., Bergues L.E.C. y Fontaine R.A. Biologic effects of the magnetically treated CM-95 Solution (submitted to Bioelectromagnetics), 2004

**Patente.**

- **Martínez C.E.**, Rodríguez B., Cobas G., Hurtado A., Pérez I., Correa M. Solución adyuvante. Patente cubana. Resolución No. 114/1999. Julio 14. Certificado No. 22583.

**Otras publicaciones relacionadas con la temática.**

- **Martínez C.E.**, Pérez I., Cobas G., Sarmiento R., Almenares J., García R., et al. Obtención de sueros policlonales para detectar bacterias del género *Bacillus*. Revista Electr., Ciencia en su PC. 1988.
- **Martínez C.E.**, Pérez I., Heredia J., Cárdenas J. Establecimiento de un procedimiento inmunológico para el control de calidad de biopreparados de *Bacillus thuringiensis*. Revista Elec. Ciencia en su PC. 1988.

**Presentación de los resultados en Eventos nacionales e internacionales.**

- **Martínez C.E.**, Infante J., Sierra G., Delgado L., Cobas G., et al, Evaluación de la Sustancia CM-95 como adyuvante inmunológico. Forum nacional de electromagnetismo Aplicado Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. 8 de Octubre, 1996. Santiago de Cuba.
- **Martínez C.E.**, Sierra G., Lebeque Y., Santos W., Cobas G., Almenares J., Fontainer R. Evaluación de la Sustancia CM-95 tratada magnéticamente inoculada por vía subcutánea e intravenosa junto aun antígeno particulado como inmunopotenciador. II Jornada Nacional de Inmunología. Ciudad de la Habana. Sociedad de Inmunología. 8-10 de Diciembre, 1997.
- **Martínez C.E.**, Infante J., Sierra G., Delgado L., Cobas G., et al. Evaluación de la Sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos particulados en ratones Balb/c por vía Intraperitoneal II Jornada Nacional de Inmunología. Ciudad de la Habana. Sociedad Cubana de Inmunología. 8-10 de Diciembre, 1997.
- **Martínez C.E.**; Pérez I., Sierra G., Santos W., Morris H., Tamayo V., Fontainer R., Almenares J., Cobas G. Efectos Biológicos de la Sustancia CM-95 tratada

magnéticamente. I Congreso Nacional de Inmunología y II Jornada Nacional de Inmunología. Ciudad de la Habana ,3-5 DIC, 1998.

- **Martínez C.E.;** Pérez I., Sierra G., Santos W., Morris H., Tamayo V., Fontainer R., Almenares J., Cobas G. Efectos inmunobiológicos de la Sustancia CM-95 tratada magnéticamente. XII Forum Tecnológico Especial Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Ciudad Santiago de Cuba .16 de Octubre, 1998.
- **Martínez C.E.,** Pérez I., Heredia J. Establecimiento de un procedimiento inmunológico con sueros anti *Bacillus* para el control de calidad del biopreparado de *Bacillus thuringiensis* .REDBIO 98. Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Habana 1-5 Junio, 1998.
- **Martínez C.E.;** Pérez I., Fontaine R., Morris H. Efectos de la Solución CM-95 tratada magnéticamente en calidad de adyuvante inmunológico para la obtención de un suero somático antibacteriano en Conejos Nueva Zelandia Blanco. II taller Internacional de Bioelectromagnetismo .Santiago de Cuba .14-17 Agosto, 2000.
- **Martínez C.E.,** Pérez I., Morris H., Tamayo V., Fontainer R. Efectos de la Solución CM-95 tratada magnéticamente sobre diferentes componentes celulares de la Respuesta inmune. II Taller Internacional de Bioelectromagnetismo. Santiago de Cuba. 14-17 Agosto, 2000.
- **Martínez C.E.,** Pérez I., Santos W., Morris H., Fontainer R. Efectos biológicos de la Solución de sales CM-95 tratada magnéticamente en intensidades de 0,01-0,16 T (100- 1600 G). II Taller Internacional de Bioelectromagnetismo. Santiago de Cuba. 14-17 Agosto, 2000.
- **Martínez C.E.,** Efectos de CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico para la obtención del Kit Diagnóstico anti- *Bacillus*. Conferencia en el Taller Nacional de Generalización del Kit Diagnóstico anti *Bacillus*. Centro de Convenciones Heredia de Santiago de Cuba. 18 de Mayo, 2000.
- **Martínez C.E.,** Pérez I., Cobas G., Heredia J., Toro M. Introducción en dos provincias orientales del serodiagnóstico para el género *Bacillus* en el proceso productivo de Bioplagicidas .AGROBIOTEC. Biotecnología. Habana 2002, 29 de Noviembre, 2002.

- **Martínez C.E.**, Pérez I., Morris H., Fontainer R. Inmunopotenciación de CM-95 tratada magnéticamente sobre células blancas de la sangre. 17<sup>ma</sup> Conferencia Internacional de Química. Santiago de Cuba. 6 de Diciembre 2002.
- Heredia J. **Martínez C.E.** et al. Detección de contaminantes el género Bacillus, mediante el uso del Kit diagnóstico anti- Bacillus en el control e calidad de los biopreparados en los CREE. XV Forum de Ciencia y Técnica Especial de salud. Santiago de Cuba, 7de Noviembre 2003.

### **Premios Recibidos.**

- **Martínez C.E.**, Pérez I., Cobas G., Fontaine R. Obtención d sueros policlonales para detectar bacterias del género Bacillus. Enero, 1995.**PREMIO ANUAL PROVINCIAL CITMA.1995.**
- **Martínez C.E.**, Pérez I., Heredia J., Cárdenas J. Establecimiento de un procedimiento inmunológico con sueros anti Bacillus para el control de calidad del biopreparado de *Bacillus thuringiensis*. **PREMIO ANUAL PROVINCIAL CITMA 1996.**

### **Diploma a los resultados.**

- **Martínez C.E.**, Infante J., Sierra G., Delgado L., Cobas G., et al, Evaluación de la sustancia CM-95 como adyuvante inmunológico. Fue seleccionado como resultado destacado en el XII Forum Nacional de Electromagnetismo Aplicado; 1998.
- **Martínez C.E.**, Pérez I., Sierra G., Santos W., Morris H., Tamayo V., Fontainer R., Almenares J., Cobas G. Efectos inmunobiológicos de la Sustancia CM-95 tratada magnéticamente. Por haber sido seleccionado como destacado en el XII Forum Tecnológico Especial Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Ciudad Santiago de Cuba 1998.