

Centro de Investigaciones de Energía Solar. Santiago de Cuba

## ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS

*Lic. Humberto Joaquín Morris Quevedo, Lic. Clara Martínez Manrique, Lic. Roberto T. Abdala Díaz e Ing. Denia Campos Orama*

### RESUMEN

La búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante/inmunopotenciadora constituye una de las tendencias más importantes en la investigación inmunológica actual. El presente trabajo considera los criterios fundamentales que determinan la selección de un adyuvante con fines investigativos, en el campo de la salud veterinaria y en la formulación de vacunas humanas, con el objetivo de incrementar la efectividad de la respuesta inmune. Se analizan brevemente las principales dificultades identificadas en la literatura, relacionadas con la comparación de la efectividad de diferentes adyuvantes, y se destacan las amplias posibilidades que ofrecen los productos naturales, especialmente polisacáridos de diversas fuentes, en la tamización de sustancias con propiedades inmunoestimulantes.

*Descriptor DeCS:* ADYUVANTES INMUNOLOGICOS; VETERINARIA EN SALUD PUBLICA.

Las sustancias inmunomoduladoras constituyen una familia muy heterogénea si se toman en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica.<sup>1</sup> Dentro de ellas ocupan un lugar muy importante los agentes inmunopotenciadores, a los cuales se les atribuyen 2 funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y, por otra parte, la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta de los animales de laboratorio durante la inmunización experimental con vistas a la producción de antisueros.<sup>2</sup> Los avances experimentados en la última década en la

síntesis de péptidos, la secuenciación de nucleótidos y la ingeniería genética han posibilitado el desarrollo de las denominadas "vacunas de nueva generación";<sup>3</sup> sin embargo, la utilización exitosa de estas nuevas tecnologías requiere de un esfuerzo investigativo sostenido para hallar sustancias con actividad inmunopotenciadora (adyuvantes), eficaces en la estimulación de la respuesta inmune y desprovistas de propiedades biológicas adversas.<sup>4</sup>

Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos.<sup>5</sup>

El mecanismo de acción de estas sustancias ha sido objeto de numerosos estudios y, al parecer, existen diversos factores que explican su modo de acción. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de sus funciones importantes es crear un reservorio o depósito del antígeno de larga vida. Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos;<sup>6</sup> éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos.<sup>7</sup> Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos; pero, en general, éstas funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras al tejido linfoide.<sup>8</sup>

En el nivel internacional, la lista de productos naturales y derivados de la síntesis química, con propiedades adyuvantes/inmunopotenciadoras, es cada vez mayor; sin embargo, sólo un reducido número se utiliza en la formulación de vacunas veterinarias y humanas, existiendo una tendencia relacionada con la evaluación de nuevas sustancias con esta finalidad. En función del campo de aplicación y de la relación eficiencia/seguridad se pueden reconocer diferentes categorías de adyuvantes (tabla), que serán examinadas a continuación con más detenimiento.

### SELECCIÓN DE UN ADYUVANTE CON FINES INVESTIGATIVOS

Con fines investigativos, las exigencias más importantes se relacionan con una elevada eficacia, un amplio espectro de aplicación, una fácil manipulación y, por supuesto, la disponibilidad comercial.

El adyuvante completo de *Freud* (FCA) ha sido utilizado durante más de 50 años

TABLA. Relación entre las aplicaciones de los adyuvantes y la relación eficiencia/seguridad

Adyuvantes	La eficiencia es más importante que la seguridad		La seguridad es más importante que la eficiencia	
	Animales de laboratorio	Animales para la alimentación	Animales de compañía	Humanos
FCA	+	-	-	-
Emulsiones aceite/agua	+	+	(-)	-
Emulsiones agua/aceite	+	+	-	-
Materiales inertes	+	(+)	(+)	(-)
Compuestos de aluminio	+	+	+	+
Liposomas	+	+	(+)	(-)
Saponinas	+	(+)	(+)	(-)
DDA	+	(+)	(+)	(-)
NBP	+	(+)	(+)	(-)

Leyenda +: aplicado de rutina en productos comerciales; (+): no aplicados, pero se considera aplicable en función de su seguridad; -: no aplicado y considerado no aplicable por problemas de seguridad; (-): no aplicado y considerado no aplicable, excepto para fines muy específicos.

en la producción de antisueros en animales<sup>9</sup> y es empleado con frecuencia cuando se dispone de cantidades limitadas de antígenos o cuando presentan una baja inmunogenicidad. La gravedad de su toxicidad fue reconocida inmediatamente, pero los esfuerzos por encontrar opciones igualmente efectivas y menos tóxicas no han resultado del todo exitosos. Con los avances alcanzados en numerosas áreas de las ciencias biológicas y el creciente interés por el bienestar de los animales de experimentación, existe una considerable presión para restringir el uso del FCA, y aunque no se cuenta en la actualidad con alternativas definitivas para este adyuvante, en diferentes estudios comparativos se informan resultados estimulantes en cuanto a eficiencia, menor número de efectos adversos y mayor facilidad en la manipulación.<sup>8</sup>

En la investigación pueden utilizarse, además, los compuestos de aluminio, la formulación "Syntex-1" (SAF-1) que contiene el treonil análogo del dipéptido murámico, polímeros no iónicos en bloque (NBP), saponinas, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA), lipopéptidos, etc.

### **SELECCIÓN DE UN ADYUVANTE EN EL CAMPO DE LA SALUD VETERINARIA**

En este campo, la eficacia es un elemento de gran importancia y se toleran ciertos niveles de efectos colaterales. Los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral (del tipo aceite en agua o agua en aceite) y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). En algunos casos, se emplean liposomas, saponinas, vitamina E, complejos inmunoestimulantes

(ISCOM<sub>s</sub>), así como diferentes emulsiones de aceites de origen vegetal o animal. Las emulsiones de aceite mineral, especialmente las del tipo agua en aceite, si bien inducen una fuerte respuesta inmune, pueden provocar riesgos y efectos no deseados, a causa posiblemente de su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad.<sup>10</sup>

Por tal razón, se han realizado numerosos intentos para desarrollar adyuvantes eficaces y a la vez seguros. Ejemplo de ello es la formulación compuesta por sulfolipopolisacáridos sintéticos, con características hidrofóbicas, incorporados a una emulsión de escualeno en agua, desarrollada por la compañía belga Solvay SA. Este adyuvante ha sido validado exitosamente en animales de laboratorio con antígenos proteicos y virales, y resulta, al menos, tan efectivo como los adyuvantes basados en aceite mineral, empleados hoy día en diversas vacunas veterinarias.<sup>11</sup>

### **ADYUVANTES PARA VACUNAS HUMANAS**

El criterio más importante, sin lugar a dudas, para la selección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad y, en la práctica, los compuestos de aluminio son los únicos adyuvantes licenciados para uso humano.<sup>3</sup>

El hidróxido de aluminio tiene un punto isoeléctrico de 11,1 y, por tanto, está cargado positivamente en las condiciones biológicas, por lo que puede adsorber proteínas cargadas negativamente y adsorber débilmente las proteínas básicas. El grado de adsorción depende de la naturaleza y concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones bufferantes y del pH de la mezcla resultante.<sup>4</sup> Las fuerzas de atracción electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas son las responsables de la

adsorción de los antígenos a los adyuvantes que contienen aluminio, pero probablemente las fuerzas de *Van der Waals* y los enlaces de hidrógenos también contribuyan a la adsorción en estos sistemas;<sup>12</sup> sin embargo, se ha señalado que el alumbre puede inducir anticuerpos de la clase IgE, así como reacciones alérgicas.<sup>13</sup> Según las regulaciones de la FDA, son permisibles cantidades no mayores de 0,85 mg de aluminio por dosis de vacuna.<sup>14</sup>

Las nuevas vacunas recombinantes y sintéticas poseen una baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas tradicionales, consistentes en los microorganismos intactos, atenuados o inactivados por el calor; de ahí el interés por la búsqueda de diferentes inmunoadyuvantes para incrementar la efectividad de estas nuevas vacunas para uso humano.<sup>3</sup> En este sentido, *Tamura* y otros,<sup>15</sup> notifican en estudios realizados en ratones, la utilidad de 2 derivados del dipéptido murámico como adyuvantes para la vacuna recombinante de la hepatitis B, primera de esta categoría en ser licenciada para uso en humanos y disponible comercialmente en forma adsorbida al alumbre. La respuesta de anticuerpos obtenida con los derivados del MDP resultó similar a la inducida por la vacuna adsorbida en alumbre y se discute, por los autores, el posible papel de estos compuestos como su sustituto.

## ASPECTOS PRÁCTICOS

En los estudios relacionados con la evaluación de la efectividad de diferentes adyuvantes se impone dejar reglamentadas líneas generales, que permitan solucionar las principales dificultades existentes en este campo en la actualidad, entre las que pueden citarse:

1. No existencia de criterios estandarizados para determinar la eficacia de los adyuvantes;

2. la mayoría de los estudios adolecen de formulaciones estandarizadas como referencias apropiadas;
3. los niveles de inmunoestimulación alcanzados con los distintos adyuvantes no se indican de forma explícita en los trabajos publicados;
4. en general, las condiciones para lograr la eficiencia óptima (tipo de antígeno, ruta de inmunización, especies animales, etc.) no han sido establecidas.

Estos aspectos han sido reconocidos por *Stewart-Tull*,<sup>4,16</sup> quien propuso una estrategia para la estandarización de la eficacia de los adyuvantes, la cual contempla la utilización de la ovoalbúmina y el virus de la influenza como antígenos estándares, el empleo de adyuvantes de referencia y parámetros definidos por la inmunidad (determinación de los títulos de anticuerpos por ELISA), entre otros criterios.

## PROPIEDADES INMUNOPOTENCIADORAS DE POLISACÁRIDOS NATURALES

Las propiedades inmunomoduladoras han sido demostradas en numerosos polisacáridos naturales y algunos derivados obtenidos por hidrólisis o modificación química. La actividad estimulante de la hematopoyesis y de la respuesta inmune humoral y celular es uno de los rasgos más significativos de los glucanos aislados de la pared celular de levaduras.<sup>17</sup> Ha sido mostrado por diferentes autores que la administración simultánea del glucano y un antígeno estimula la formación de anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión; prueba de ello es la estimulación por los glucanos de la respuesta humoral y mediada por células contra *Francisella tularensis* y *Pseudomonas*

*pseudomallei*.<sup>18</sup> Además, se ha descrito la estimulación de la síntesis de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en curieles después de la administración del glucano<sup>19</sup> y se ha reconocido el efecto adyuvante en *Leishmania major*, *Mycobacterium leprae*, *Candida albicans*, *Herpes simplex* y el virus de la hepatitis murina.<sup>20</sup>

Por otra parte, la administración oral de un extracto de glucanos (Glucanil) de *Candida albicans* ATCC 20995, suministrado a ratones 10 días antes de la infección experimental con *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, incrementó significativamente la resistencia a la infección sistémica con estos microorganismos y los estudios toxicológicos revelaron que el producto era altamente tolerado.<sup>21</sup>

En algunos experimentos, la actividad del glucano resultó superior a la de adyuvantes usados comúnmente. El efecto del glucano depende del modo de administración, y aunque este último puede ser realizado de forma repetida, el efecto estimulador suele ocurrir después de una inyección única.<sup>22</sup>

Los hongos constituyen otra fuente valiosa de polisacáridos con actividad inmunomoduladora. En este sentido, posiblemente el ejemplo más estudiado sea el lentinan, un B (1-3) D-glucano con ramificaciones B(1-6) D-glucopiranosidas, aislado del hongo comestible *Lentinus edodes*, el cual es capaz de restablecer o aumentar la capacidad de respuesta del huésped a las citoquinas u otros factores bioactivos intrínsecos mediante la estimulación de la maduración, diferenciación o proliferación, o ambas, de las células involucradas en los mecanismos de defensa del huésped.<sup>23</sup> El lentinan también incrementa la resistencia del huésped a varios tipos de infecciones bacterianas, virales y parasíticas y su contribución a la restauración de la disfunción inmunológica ha sido demostrada en pacientes con neoplasias.<sup>24</sup>

En la literatura médica existen referencias, además, de la actividad inmunomoduladora del esquizofilan, aislado del hongo *Schizophyllum commune* y de 2 polisacáridos (AT-HW y AT-AL) de los cuerpos fructíferos de *Armillariella tabescens*, los que ejercen un efecto potenciador del sistema reticuloendotelial y de la actividad mitogénica y su administración está acompañada de un incremento en el número de células del exudado peritoneal y de la activación de los macrófagos.<sup>25</sup>

La activación del sistema del complemento (vías clásica y alternativa) por B(1-3) D-glucanos, presentando diferente ultraestructura y grado de ramificación aislados de la pared celular de hongos, ha sido demostrada con el empleo de suero y plasma humanos.<sup>26</sup>

Por otra parte, en estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, la fracción polisacáridica ha estimulado las funciones fagocíticas de los macrófagos murinos, las cuales dependen en gran medida del contenido de grupos sulfato en su estructura.<sup>27</sup>

También se ha comprobado que las propiedades inmunoestimulantes de numerosos preparados que se usan tradicionalmente en la Medicina Oriental, son atribuibles a diferentes fracciones polisacáridicas presentes en su composición.<sup>28</sup>

Desde el punto de vista de la inmunización de especies de interés económico, se han alcanzado resultados muy prometedores con el empleo de antígenos enlazados a polisacáridos, como el J-carragenano en aves y el sulfato de dextrano en el ganado,<sup>29</sup> los cuales confirieron protección a los animales en un encuentro posterior con los citados antígenos.

En ese contexto, durante los últimos años se han dado importantes pasos en la utilización de polisacáridos como adyuvantes inmunológicos. A modo de ejemplo pode-

mos mencionar la formulación Adjuvax<sup>TM</sup> (*Alpha-Beta Technology*, Worcester, MA, USA), cuyo componente con actividad inmunomoduladora es un polisacárido de la clase de los glucanos, donde el antígeno se incorpora a la matriz polisacáridica con una breve retención; y el polímero acetilado de la manosa, registrado comercialmente como Acemannan (*Carrington Labs. Inc.*, TX, USA), que se emplea en la vacuna contra el virus de la enfermedad de Marek en las aves.<sup>30</sup>

Dentro del universo microbiano, las algas microscópicas comprenden un grupo muy diverso de microorganismos fotosintetizadores de más de 30 000 especies, que se caracterizan por presentar una elevada velocidad de crecimiento y una gran eficiencia en el uso de la energía luminosa. Los efectos promotores de la salud humana atribuidos a las algas se conocen desde tiempos inmemoriales, a causa de las antiguas experiencias en su uso por los aztecas y agrupaciones del África Central.<sup>31</sup>

Estas acciones positivas sobre el estado fisiológico general del organismo se han relacionado con la activación de los mecanismos de protección inmunitaria inherentes a él por sustancias naturales de elevado potencial terapéutico, entre las cuales los polisacáridos adquieren un valor especial.<sup>32</sup>

Tomando en consideración estos elementos, existe actualmente un gran interés por el estudio de la posible actividad inmunopotenciadora de las fracciones polisacáridicas de las microalgas (tanto intracelulares como exocelulares), pues la evaluación del efecto farmacológico de estas sustancias depende de manera primaria del establecimiento de condiciones definidas de cultivo. Al respecto, las propiedades inmunorreguladoras de ciertos extractos de *Chlorella* han sido atribuidas a su importante composición polisacárida [Centro de Investigaciones de Energía So-

lar. Informe de la revisión de patentes sobre extractos de microalgas. Santiago de Cuba, 1994] y, por otra parte, se ha observado que la fracción polisacáridica intracelular de *Spirulina platensis* estimula la proliferación de los linfocitos T y las células NK, por lo cual podría resultar sumamente válido para la investigación sobre tumores.<sup>33</sup>

Por otro lado, en experimentos *in vitro* con leucocitos mononucleados de sangre periférica humana se ha demostrado un efecto estimulante de la síntesis de anticuerpos (inmunoglobulinas) de 3 fracciones polisacáridicas del alga roja unicelular *Porphyridium cruentum*, sugere de una actividad moduladora sobre los linfocitos B.<sup>33</sup> El mecanismo de dicha estimulación es aún desconocido.

Por todo lo anterior concluimos que por razones de naturaleza práctica y económica, tanto en la investigación inmunológica fundamental como en la aplicación de los conocimientos derivados de ella en la producción de antiseros y vacunas, reviste una importancia primordial la utilización de los adyuvantes/inmunopotenciadores. De particular interés resulta la valoración de nuevos inmunoadyuvantes para incrementar la efectividad de las vacunas recombinantes o sintéticas, las que poseen una baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas formuladas tradicionalmente.

En este sentido, se impone establecer líneas generales que permitan solucionar las principales dificultades existentes hoy día, relacionadas con la comparación de la efectividad de diferentes adyuvantes.

El estudio de los productos naturales, incluidos polisacáridos de diversas fuentes, ofrece amplias perspectivas para la búsqueda de nuevas sustancias con actividad inmunopotenciadora y desprovistas de propiedades biológicas adversas.

## SUMMARY

The search for new substances with immunological adjuvant activity constitutes one of the most important trends in today's immunological research work. The present paper analyzes the fundamental criteria that determine the selection of an adjuvant for research purposes in the veterinary health field and in human vaccine formulation, with a view to increasing effectiveness of immune response. The main difficulties mentioned in literature and related to the comparison of the effectiveness of various adjuvants are briefly analyzed, and also the wide possibilities of natural products especially polysaccharides of various sources in the selection of substances with immunostimulating qualities.

*Subject headings:* ADJUVANTS, IMMUNOLOGIC; PUBLIC HEALTH VETERINARY.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Takx-Kohlen BC. Immunomodulators. Future prospects. *Pharm Weekbl Sci* 1992;14:24-52.
2. Azuma I. Synthetic immunoadjuvants: application to nonspecific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine* 1992;10:1000-6.
3. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad BE, Bizzine B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvancicity. *Vaccine* 1993;11:293-306.
4. Stewart-Tull DES. Recommendations for the assessment of adjuvants (immunopotentiators). En: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, eds. *Immunological adjuvants and vaccines*. New York: Plenum, 1989:213-26.
5. Roitt IM. *essential immunology*. 7 ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1991:326.
6. Guerrero J, Gattas CR. Immunomodulating substances: an overview. *Rev Microbiol* 1982;13(2):110-5.
7. Wagnerová J, Ferencík M. Secretory and regulatory products of macrophages in the immune and inflammatory reactions. *Biol Bratislav* 1993;48(6):709-17.
8. Bennet B, Check IJ, Olsen MR, Hunter RL. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J Immunol Methods* 1992;153:31-40.
9. Freund J. the mode of action of immunological adjuvants. *Adv Tuberc Res* 1956;7:130-48.
10. Straw BE, Maclachlan NJ, Cobertt WT, Carter PB, Schey HM. comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med* 1985;49:149-51.
11. Hilgers LAT, Platenburg PLI, Luitjens A, Groenveld B, Dazelle T, Ferrari-Laloux M, et al. A novel nonmineral oil-based adjuvant. I. Efficacy of a synthetic sulfated polysaccharide in a squalene-in water emulsion in laboratory animals. *Vaccine* 1994;12:653-60.
12. Al-Shakshir RH, Regnier FE, White JL, Hem SL. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* 1995;13:41-4.
13. Veien NK, Hattel T, Justesen O, Norholm A. Aluminium allergy. *Contact Dermatitis* 1986;15:295-7.
14. May JC, Progar JJ, Chin R. The aluminium content of biological products containing aluminium adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry. *J Biol Stand* 1984;12:175-83.
15. Tamura M, Yoo GC, Yoshimatsu K, Yoshida R, Oka T, Ohkuma K, et al. Effects of muramyl dipeptide derivatives as adjuvants on the induction of antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen. *Vaccine* 1995;13:77-82.
16. Stewart-Tull DES. The assessment and use of adjuvants. En: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, eds. *Vaccine, recent trends and progress*. New York: Plenum Press, 1991:85-92.
17. DiLuzio NR. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin Immunopathol* 1985;8:387-400.
18. Reynolds JA, Castello MD, Herrington DG, Crabbs CL, Peters CJ, Jemski JV, et al. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect Immun* 1980;30:51-7.
19. Sharma A, Haq AU, Siddiqui MV, Ahmad S. Immunization of Guinea pigs against *Entamoeba histolytica* using glucan as an adjuvant. *Int J Immunopharm* 1984;6:483-91.
20. DiLuzio NR. Immunopharmacology of glucan: A broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1983;4:344-7.
21. Nicolette A, Nicoletti G, Ferraro G, Palmieri G, Mataboni P, Germogli R. Preliminary evaluation of immunoadjuvant activity of an orally administered glucan extracted from *Candida albicans*. *Arzneimittelforschung* 1992;42:1246-50.

22. Wagnerová J, Lískova A, gervenakova L, Trnovec T, Ferencik M. The immunoadjuvant effect of soluble glucan derivatives in mice. *Folia Microbiol* 1991;36:198-204.
23. Chihara G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharide. *Develop Biol Stand* 1992;77:191-7.
24. Susuki M, Takatsuki F, Maeda YY, Hamuro J, Chihara G. Lentinan-rationale for development and therapeutic potential. *Clin Immunother* 1994;2:121-33.
25. Kiho T, Shiose Y, Nagai K, Ukai S. Polysaccharides in fungi. xxx. 1) Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chem Pharm Bull* 1992;40:2110-4.
26. Susuki T, Ohno N, Saito K, Yadomae T. Activation of the complement system by (1-3) beta D-glucans having different degrees of branching and different ultrasturctures. *J Pharmacobiodyn* 1992;15:277-85.
27. Yoshizawa Y, Ametani A, Tsunehiro J, Nomura K, Itoh M, Fukui F, et al. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga *Polphyra yezoensis*: structure-function relationships and improved solubility. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995;59(10):1933-7.
28. Yamada H. Chemical and pharmacological studies on efficacy Japanese and Chinese herbal medicines. *Kitasato Arch of Exp Med* 1992;65:159-80.
29. Kungú MW, Goodger BV, Bushell GR, Wright IG, Waltisbuhl DJ. Vaccination of cattle with dextran sulphate-binding *Babesia bigemina*. *Int J Parasitol* 1992;22:621-5.
30. Muirihead S. Solvay introduces new immune stimulant product. *Feedstuffs* 1992;64:2.
31. Furst PT. *Spirulina*. *Hum Nature* 1978;60:60-5.
32. Pulz O, Koehler E. Microalgae as a source of pharmacologically valuable polysaccharides. *Proceeding of the 6<sup>th</sup> European Congress on biotechnology. firenze June 13-17. 1993,40-1.*
33. Pulz O, Koehler E. Pharmakologische Wirkung von Polysacchariden aus Microalgen. *Deutsche Gesellschaft Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) Quidlinburg März 21-22. 1994,253-64.*

Recibido: 9 de febrero de 1999. Aprobado: 19 de julio de 1999.

Lic. *Humberto Joaquín Morris Quevedo*. Centro de Investigaciones de Energía Solar, Santiago de Cuba.