

ARTÍCULO ORIGINAL

Efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente sobre parámetros hematológicos y bioquímicos en ratones Balb/c

Effects of the magnetically treated CM-95 solution on hematologic and biochemical parameters in Balb/c mice

Dra.C. Clara Esther Martínez Manrique,¹ MsC. Juan Ramón Castillo Belén,² Lic Pedro Favier Romero,³ MsC. Vivian Tamayo Ortega ⁴ y Dr.C. Gustavo Sierra González ⁵

- ¹ Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora en Ciencias de la Salud. Profesora Titular. Departamento de Bioelectromagnetismo. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
- ² Especialista II Grado en Inmunología. Máster en Informática en Salud. Profesor Auxiliar. Investigador Agregado. Facultad de Ciencias Médicas No. 1, Universidad de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, Cuba.
- ³ Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
- ⁴ Licenciada en Ciencias Biológicas. Máster en Biotecnología. Hospital Oncológico Provincial "Conrado Benítez", Santiago de Cuba, Cuba.
- ⁵ Doctor en Medicina. Doctor en Ciencias en Bioquímica e Inmunología. Profesor Titular. Centro Nacional para la Producción de Sueros y Vacunas. Instituto Nacional "Dr. Carlos J. Finlay", La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se evaluaron los efectos de la solución CM-95, tratada con campo magnético estático en el intervalo de 0,01-0,16 T e inoculada una vez en un volumen de 0,2 mL en ratones Balb/c por vía intraperitoneal y la misma solución sin tratamiento magnético en animales sin inocular, para valorar su acción sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos del metabolismo celular de estos roedores desde la fase preclínica, con vista a lo cual se procesó la sangre obtenida por sangrado total después del esquema terapéutico, así como también se calculó el número total y diferencial de leucocitos a partir del líquido sanguíneo. En el equipo autoanalizador automático Hitachi 902 se analizó el plasma extraído de cada muestra de sangre y se determinaron, entre otros elementos: proteínas totales, glucosa, creatinina, transaminasas, iones de calcio y colesterol. Se evidenció que la solución CM-95 tratada magnéticamente produjo cambios en los leucocitos sanguíneos, dados por un aumento significativo de los linfocitos con respecto a los controles, así como también en los parámetros bioquímicos, entre los cuales se modificaron los valores de glucosa, transaminasas y colesterol, pero todos dentro de límites normales para la especie. Tales resultados abren nuevas perspectivas para el posible uso de este sistema acuoso, tratado con magnetismo, en biomedicina.

Palabras clave: solución CM-95 tratada magnéticamente, ratones Balb/c, hematología y bioquímica sanguíneas

ABSTRACT

The effects of the CM-95 solution, treated with static magnetic field in the interval of 0,01-0,16 T and inoculated once in a volume of 0,2 mL in Balb/c mice intraperitoneally and the same solution without magnetic treatment in animals without inoculation were evaluated, in order to value its action on the hematologic and biochemical parameters of the cellular metabolism of these rodents from the preclinical phase. For this purpose, the blood obtained through total bleeding was processed after the therapeutic pattern, and the total and differential number of leukocytes was calculated using the blood. The extracted plasma of each sample of blood was examined in the automatic autoanalyzer equipment Hitachi 902 and among other elements, total proteins, glucose, creatinine, transaminases, calcium ions and cholesterol were determined. It was evidenced that the magnetically treated CM-95 solution produced changes in the blood leukocytes, given by a significant increase of the lymphocytes compared to the controls, as well as in the biochemical parameters, among which the values of glucose, transaminases and cholesterol were modified, but all within the normal limits for the species. Such results provide new perspectives for the possible use of this watery system, treated with magnetism, in biomedicine.

Key words: magnetically treated CM-95 solution, Balb/c mice, hematology and blood biochemistry

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías con campos magnéticos o de sistemas acuosos tratados magnéticamente constituyen aplicaciones del biomagnetismo a la medicina,¹⁻³ por los efectos biológicos que estos producen en células, tejidos y órganos.^{4,5}

De hecho, en estudios preclínicos con ratones Balb/c y conejos Nueva Zelanda blancos, Martínez *et al*⁶⁻⁸ informan que la solución CM-95 tratada magnéticamente (TM) estimula de diferentes formas los linfocitos B y T,⁹⁻¹¹ por cuanto propicia la síntesis de altos títulos de anticuerpos específicos contra bacterias y para proteínas del suero sanguíneo humano, a la vez que activa la secreción del interferón γ , entre otras acciones, y no causa efectos tóxicos preclínicos.^{12,13} Estos elementos han favorecido que la solución tratada magnéticamente sea evaluada como "candidata" a inmunopotenciadora, al modular la respuesta inmunitaria hacia un patrón de resultado preferencial Th1, propio de la inmunidad generada por células.

Con vista a completar las investigaciones preclínicas sobre el tema, en el presente trabajo se evalúan a través de parámetros hematológicos y bioquímicos en la sangre y plasma de ratones Balb/c, diferentes efectos inducidos en estos últimos por la solución CM-95 tratada magnéticamente.

MÉTODOS

La evaluación preclínica para determinar los efectos de la citada solución sobre algunos indicadores (hematológicos y bioquímicos) en esos animales de experimentación, se realizó en el Laboratorio de Ensayos Preclínicos del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado de Santiago de Cuba, en el período comprendido de mayo a noviembre del 2009.

- Biomodelo experimental

En cada grupo experimental seleccionado se utilizaron ratones Balb/c hembras, de 18-20 g de peso y 6 semanas de nacidos, suministrados por el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX[®]) de Santiago de Cuba). Los animales se mantuvieron dentro de cajas plásticas, en locales asépticos a una temperatura de 28 ± 2 °C y una humedad relativa de 60-65 %, donde se les suministró agua acidulada a un pH de 2,5-2,8 y pienso ratonina proveniente de CENPALAB (Cuba), ambos *ad libitum*. Los roedores fueron atendidos según las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio, recomendadas por el *Internacional Council for Laboratory Animals Science*.¹⁴

- Grupos experimentales

Para los experimentos se formaron 3 grupos, con 5 animales cada uno: el primero recibió una dosis de solución CM-95 tratada magnéticamente (GTM); el segundo, solución CM-95 sin tratar magnéticamente (GSTM); y el tercero, tomado como control negativo (GCN), ninguna (no inoculados).

- Tratamiento magnético de la solución CM-95

La solución CM-95, formada por una sal inorgánica a la concentración entre 0,1-2%, se hizo pasar por un equipo a imanes permanentes (certificado por el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado), a una velocidad de flujo entre 0,1- 0,5 m/s y una inducción magnética oscilante entre 0,01- 0,16 T.¹⁵

- Esquema de inoculaciones

A los ratones Balb/c, mantenidos en las condiciones ya descritas, se les inoculó por vía intraperitoneal 0,2 mL de solución CM-95 tratada magnéticamente (GTM) y sin ello (GSTM), en el tiempo 0; pero los animales del grupo control negativo (GCN) no recibieron la dosis. Al cabo de 60 minutos se les extrajo sangre con vista a ejecutar los ensayos correspondientes para todos los grupos (GTM, GSTM. Y GCN).

- Extracción de sangre

Una vez concluido el esquema de inoculaciones, la sangre de los animales se obtuvo a través del plexo retroorbital (sangrado parcial) para determinar los leucocitos sanguíneos y por medio de la punción cardíaca (sangrado total) para analizar la bioquímica del líquido.

- Técnica para el cálculo diferencial de leucocitos

Con el uso de capilares estériles se extrajo una gota de sangre a través del plexo retroorbital de cada ratón de los 3 grupos experimentales (GTM, GSTM y GCN) y se colocó en un portaobjeto limpio y desgrasado. Las láminas fueron teñidas con colorante Giensa (IMEFA).

El cálculo diferencial de leucocitos se realizó en un campo de 100 células, distinguiendo entre ellas cada tipo celular mediante observación a través de un microscopio Olimpio BDH en inmersión, a variados aumentos.¹⁶

- Técnica para la determinación de la bioquímica sanguínea

En el equipo autoanalizador automático Hitachi 902 se aplicó el plasma obtenido de cada muestra de sangre de los grupos experimentales y se determinaron las proteínas totales, la glucosa, la creatinina, las transaminasas (aspártico aminotransferasa ó ASAT y alanina aminotransferasa ó ALAT), los iones de calcio y el colesterol. Los resultados fueron expuestos en las unidades del Sistema Internacional de Medidas.

- Análisis estadístico

Para procesar los datos indispensables se utilizó el paquete estadístico en soporte electrónico SPSS 9,0 para Windows 2003. Se aplicó un ANOVA de clasificación simple y luego se compararon las medias a través de la prueba de Tukey, con un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A. Hematología sanguínea

El número de linfocitos se incrementó en el GTM (**tabla 1**), representado por diferencias significativas ($p < 0,05$) en contraste con los valores obtenidos en los grupos controles (GSTM y GCN), en los cuales no hubo significación; sin embargo, en los animales tratados magnéticamente disminuyó el volumen de los polimorfonucleares neutrófilos, pero aumentó significativamente en los GSTM y GCN ($p < 0,05$) con respecto a los ratones del grupo de estudio, pero no entre ellos ($p > 0,05$).

Tabla 1. Valores hematológicos (media \pm estándar) en las variables analizadas de ratones Balb/c inoculados con la solución CM-95 tratada magnéticamente

Leucocitos sanguíneos (%)	Grupos experimentales M \pm DE		
	GTM	GSTM	GCN
Linfocitos	^a 76,6 \pm 4,16	^b 68,0 \pm 2,00	^b 67,3 \pm 4,16
Neutrófilos	^b 23,3 \pm 4,16	^a 32,0 \pm 2,00	^a 34,4 \pm 5,29
Monocitos	0,0	0,0	0,0
Eosinófilos	0,0	0,0	0,0

B. Parámetros de la bioquímica sanguínea

En la **tabla 2** se exponen los resultados de la bioquímica sanguínea en los 3 grupos de ratones Balb/c.

La glucosa aumentó con valores significativos en el grupo GTM con respecto a los otros, si bien el GSTM presentó diferencias estadísticas con el GCN ($p < 0,05$), una hora después de haber sido inoculados con la solución tratada magnéticamente.

En cambio, la creatinina no mostró significación entre los grupos ($p < 0,05$); sin embargo, en los animales integrantes del GTM que recibieron la solución CM-95 tratada magnéticamente, los resultados de las transaminasas, tanto de ALAT como ASAT, fueron inferiores en contraste con los de ambos controles (GSTM y GCN). En este caso, las diferencias estadísticas se presentaron en la ALAT del grupo GCN con

respecto al GSTM y GTM; pero, a su vez, el GSTM tuvo valores estadísticamente distintos en comparación con el GTM ($p < 0,05$). Las enzimas ASAT se diferenciaron significativamente en el GSTM y GCN con referencia al GTM ($p < 0,05$), pero no entre ellos ($p > 0,05$).

El calcio también alcanzó valores similares entre los grupos GTM, GSTM y GCN, sin diferencias estadísticas entre uno y otros ($p > 0,05$), por lo cual fueron considerados dentro de límites normales.

Por su parte, el colesterol disminuyó ligeramente en el grupo GTM con respecto a los controles (GSTM y GCN), pero estos últimos presentaron diferencias significativas al compararlas con las del grupo que recibió la solución tratada magnéticamente ($p < 0,05$).

De las proteínas totales, los mayores valores registrados en el grupo GCN se diferenciaron estadísticamente de los obtenidos en los controles ($p < 0,05$); pero entre estos 2 grupos no hubo significación alguna ($p > 0,05$), a pesar de que el GTM mostró resultados superiores al GSTM.

Tabla 2. *Parámetros de la bioquímica sanguínea en ratones Balb/c inoculados con la solución CM-95, tratada magnéticamente*

Parámetros Bioquímicos	Grupos experimentales M \pm DE		
	GTM	GSTM	GCN
Glucosa (g/L)	7,58 \pm 0,1 ^a	7,14 \pm 0,17 ^b	6,0 \pm 0,14 ^c
Creatinina (g/L)	20,0 \pm 1,4 ^a	24,96 \pm 0,63 ^a	21,4 \pm 2,05 ^a
ALAT (U/L)	151,5 \pm 4,6 ^c	343,8 \pm 3,54 ^b	424,7 \pm 3,73 ^a
ASAT (U/L)	274,3 \pm 3,4 ^b	501,0 \pm 4,77 ^a	481,4 \pm 4,98 ^a
Calcio (nmol/L)	2,3 \pm 0,4 ^a	2,27 \pm 0,06 ^a	2,31 \pm 0,02 ^a
Colesterol (nmol/L)	2,34 \pm 0,06 ^b	2,67 \pm 0,12 ^a	2,71 \pm 0,027 ^a
Proteínas totales (g/L)	57,82 \pm 3,2 ^b	51,56 \pm 1,79 ^b	63,86 \pm 2,32 ^a

DISCUSIÓN

El resultado en las células blancas de la sangre también fue registrado por Martínez *et al*⁸ en otros trabajos, quienes lograron aumentar numéricamente los linfocitos, aunque con un esquema de inoculaciones distinto y la misma inducción magnética fluctuante entre 0,01-0,16 T.

Diversos científicos¹⁷ han informado que el campo magnético puede modificar el número de células blancas en la sangre, pero sin cambios morfológicos; por consiguiente, estas variaciones pueden corresponderse con una disminución del volumen linfocitario, demostrado por Picazo *et al*¹⁸ cuando evaluaron los efectos de un campo de frecuencias extremadamente bajas de 0,1 mT y 50 HZ. Tales resultados no coinciden con los obtenidos al inocular la solución CM-95 tratada magnéticamente, por cuanto esta incrementó en mayor medida la proporción de linfocitos y avaló los efectos inmunoestimulantes de ese sistema acuoso tratado con magnetismo, según hallazgos de Martínez *et al*.^{6-8, 10}

A su vez, el descenso del número de neutrófilos resulta típico de una sustancia que no induce procesos inflamatorios por sí sola, lo cual deviene también una característica de la solución CM-95 cuando es tratada magnéticamente. Todo ello ha sido avalado por estudios anatomopatológicos microscópicos y macroscópicos, no incluidos en este trabajo.¹¹

En el caso de la glucosa como parámetro bioquímico evaluado en el plasma sanguíneo de los ratones Balb/c, puede decirse que se obtuvieron otros resultados (no descritos en el presente artículo) en ratas Sprague Dowley, cuyos respectivos intestinos adsorbieron la sustancia en mayor cantidad cuando fueron inoculadas con la solución CM-95 tratada magnéticamente.

Lo anterior podría justificar la tendencia a su aumento en el torrente sanguíneo en los primeros tiempos del esquema terapéutico. Otros experimentos, basados en 2 inoculaciones con la solución TM, pusieron de relieve que el nivel de glucosa en el suero sanguíneo fue aun menor, posiblemente atribuible al hecho de que dicha solución estuvo más tiempo en contacto con las células y, por ende, pudo disponerse de más glucosa para ser utilizada, pero también para que penetrara más rápidamente en estas últimas, lo cual pudiera explicar la disminución de sus valores en sangre con respecto a los obtenidos al aplicar una dosis; además de ello, la movilización para efectuar los procesos metabólicos, en especial los del sistema inmunitario, se activa en mayor medida bajo la acción de esta solución tratada con magnetismo.^{8, 10}

En este estudio, los resultados con la creatinina revelaron una función renal adecuada, puesto que no se elevó en la sangre como consecuencia de un mal funcionamiento de los riñones; pero tampoco se produjo en los controles, toda vez que los valores superiores al GTM en el líquido sanguíneo, se hallaban dentro del rango de los considerados como normales para la especie. En resumen, estas variaciones entre los grupos experimentales no representaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

La repercusión metabólica de la solución CM-95 tratada magnéticamente sobre las transaminasas, además de mostrar que posee un valor diagnóstico para el normal funcionamiento hepático y cardíaco, podría ser valorada como un posible efecto protector para estas células. Las transaminasas son enzimas que aumentan en sangre cuando existe daño hepático, sobre todo las ALAT; o cuando hay algún tipo de trastorno cardíaco, fundamentalmente las ASAT, por la presencia de determinadas afecciones.¹⁶

El metabolismo del calcio, que es un "mensajero secundario" de gran importancia en las reacciones químicas celulares, se activa con el uso del campo magnético mediante inducciones magnéticas de frecuencias extremadamente bajas, con reversibilidad en sus valores y en tiempos de aplicación superiores a la hora.^{2, 19}

A su vez, la concentración disminuida del colesterol plasmático en el grupo TM no significó afectación metabólica de los lípidos, pues se encuentra dentro de los parámetros normales para la especie, con valores que se sitúan por debajo en ambos controles (GSTM y GCN). Al respecto, algunos autores²⁰ señalan que el campo magnético puede variar el metabolismo celular y posiblemente el de los lípidos, al repercutir en la concentración de esta sustancia orgánica en la sangre.

También las proteínas totales en plasma experimentaron cambios en el GTM; pero aun con estas diferencias, sus valores se estimaron como normales para la serie.

Finalmente puede plantearse que los efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente modificaron los valores de los parámetros hematológicos y de la bioquímica sanguínea en los ratones Balb/c, al ser inoculada en una dosis. Estos resultados fueron más significativos en los linfocitos, transaminasas y colesterol del grupo GTM con respecto a los controles GSTM y GCN, pero sin presuponer daños para el metabolismo celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chiabrera AC, Nicole HP. Interaction between electromagnetic fields and cells. *Adv Sci* 1984;97:76-80.
2. Asociación Independiente para Defender la Salud. Declaración de Alcalá de Henares. Zaragoza, abril 2002. <<http://www.asides.es/llamamientos.html#Llagostera>>[12 mayo 2010].
3. Klassem VJ. Watery system magnetization. Moscú: Chemistry, 1982:22-8.
4. Zhadin MN. Review of Russian literature on biological action of DC and low frequency AC magnetic field. *Bioelectromagnetics* 2001;22(1):27-47.
5. Larry A, Batelle P. Biological effects of EMF. What we know in 2003 from annual research? *Boelectromagnetics Society, 25 Annual Meeting Bioelectromagnetics*, 2003.
6. Martínez C, Portuondo I, Infante JF, Sierra G, Delgado L, Cobas G, et al. Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos particulados en ratones de la línea Balb/c por vía intraperitoneal. *Vaccimonitor* 1998; (11):2-6.
7. Martínez CE, Cobas G, Lebeque Y, Fontaine R, Pérez I, Morris H, et al. Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotecnol Aplic* 2003;20:22-5.
8. Martínez CE, Pérez I, Fontaine R, Morris H. Efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente sobre células mononucleares en ratones Balb/c. *Biotecnol Aplic* 2004;21:224-8.
9. Martínez CE. Modulación de la respuesta inmune. Tendencias actuales. *Rev Cubana Investig Bioméd* 2006;25(4) [artículo en línea]. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002006000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=es>[consulta: 21 mayo 2010].
10. Martínez C, Tamayo V, Sierra G. Obtención del suero anti IgG humano con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico [artículo en línea]. *MEDISAN* 2007;11(4). <http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_4_07/san09407.htm> [consulta: 12 mayo 2010].
11. Martínez CE, Toledano HM, Rodríguez GS, Andina GL, Lasalle Sierra G. Solución CM-95 tratada magnéticamente en comparación con el adyuvante de la obtención del suero de Coombs. *Vaccimonitor* 2009;18(3):5-12.

12. Martínez CE, Díaz J, Alfonso A, Pardo T, Esmérido J, Puente E, et al. Toxicidad por dosis repetida de la solución CM-95 tratada magnéticamente en ratas Sprague Dowley. *Vaccimonitor* 2008;17(2):29-33.
13. Díaz BJ, Martínez MC, Alfonso EA, Pardo TA, Esmérido BJ, Salas M, et al. Evaluación de la toxicidad aguda oral e irritación sobre la mucosa bucal de la solución CM-95 tratada magnéticamente. *Acta Toxicol* 2008; 16(2):34-40.
14. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Hematology and clinical biochemistry reference values. En: *Guide to the care and use of experimental animals*. Ottawa: CCAC Publishing House, 1984; t1:86-8.
15. Martínez CE, Rodríguez B, Cobas G, Hurtado A, Pérez I, Correa M. Solución adyuvante. La Habana. Patente cubana 22583-1114 de 19 de julio de 1999.
16. Colina JA, Álvarez RE, Cruz RC, Ballester JM. *Laboratory*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1989; t1.
17. Bacttolectti JH. Exposure of Rhesus monkeys to 2 000 g. Steady magnetic fields effects on blood parameters. *Med Physiol* 1981;8:115-8.
18. Picazo ML, Royuela M, Vera R, Romo MA, Paniagua R, Bardasano JL. Estudio preliminar de la ultraestructura del músculo esquelético de ratones envejecidos bajo la exposición crónica a un campo magnético ELF. Congreso de Bioelectromagnetismo y Salud Pública. Libro resumen. Madrid: Universidad de Alcalá, 1997:73-80.
19. Azanza MJ. *Magnetic fields and calcium assesement of risk with non ionizing radiations in medicine and biology*. Alonso de Santa Cruz: Institute of Bioelectromagnetism, 1989.
20. Bardasano JL, Elorrieta JL. *Bioelectromagnetism, science and health*. Madrid: McGraw-Hill, 2000.

Recibido: 24 de junio de 2010

Aprobado: 15 de julio de 2010

Dra.C. Clara Martínez Manrique. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.
Avenida de las Américas s/n Código postal 60400, Santiago de Cuba, Cuba.
Dirección electrónica: clarita@cnea.uo.edu