

Toxicidad por dosis repetidas de la solución CM-95 tratada magnéticamente en ratas Sprague Dawley

Clara E. Martínez¹, Jorge Díaz², Alfredo Alfonso², Ana M. Pardo³, Juan Esmérico Betancourt², Edgar Puente², Hilario Salas², Yoandra Mora², Petra Aguilera², Narvis Sedeño², Eblis Aguilera³, Karina Rojas³, Anoy Rodríguez³, Gustavo Sierra⁴.

¹ Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente. Avenida de Las Américas S/N. Santiago de Cuba, Cuba.

² Centro de Toxicología y Biomedicina. Autopista Nacional Km 1 1/2. Santiago de Cuba, Cuba.

³ Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Patricio Lubumba S/N. Carretera de Cuabitas. Santiago de Cuba, Cuba.

⁴ Instituto Finlay. Centro de Investigación – Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202. La Lisa. Ciudad de La Habana, Cuba.

Correo electrónico: clarita@cnea.uo.edu.cu; jorge@toxi.scu.sld.cu

En este trabajo se realizó la evaluación toxicológica a dosis repetidas por el método de test límite del candidato a inmunopotenciador, la solución CM-95 tratada magnéticamente, acorde con las regulaciones de la Organización para la Colaboración Económica y el Desarrollo, incluida en la Guía 407. El objetivo fue establecer las posibles lesiones orgánicas y funcionales ocasionadas por la solución CM-95, tratada magnéticamente con la máxima inducción magnética permisible (0,16 T), para la obtención del candidato a inmunopotenciador. Se emplearon tres grupos: Experimental, Control y Satélite. Como Biomodelo experimental se utilizaron ratas Sprague Dawley machos y hembras con pesos de 150 a 200 g. Durante el estudio no se registraron signos clínicos de toxicidad ni muertes en ninguno de los animales de los grupos tratados, ni en los controles. No hubo afectación del peso corporal durante el ensayo. Aunque hubo variaciones en los valores de algunos parámetros hematológicos y bioquímicos, estos no tuvieron significación biológica. No se encontraron lesiones macroscópicas, ni microscópicas; solo se observaron efectos proliferativos en el tejido linfóide de timo y bazo, relacionados con la respuesta del sistema inmune. La solución CM-95 tratada magnéticamente, no mostró toxicidad en el modelo animal y nivel de dosis utilizado, y bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Palabras clave: Toxicología, dosis repetidas, solución CM-95 tratada magnéticamente, ratas Sprague Dawley.

Introducción

Las sustancias inmunopotenciadoras cobran gran importancia en su empleo como fármacos, en el tratamiento de las inmunodeficiencias, enfermedades infecciosas (bacterianas, parasitarias o virales); y en especial en el tratamiento del cáncer cuando las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune (1). Estos agentes, además, constituyen una “herramienta” poderosa para la obtención de sueros policlonales, anticuerpos monoclonales y vacunas profilácticas o terapéuticas, dentro de ellas las vacunas obtenidas por la tecnología del ADN recombinante o de antígenos sintéticos, llamadas vacunas de nueva generación (1).

A pesar de los avances que se han experimentado en este campo, la mayoría de estas sustancias poseen efectos tóxicos que invalidan su uso en humanos y animales. Es por ello que los beneficios de la incorporación de nuevos inmunopotenciadores deben ser sopesados con el riesgo de las reacciones adversas que estos compuestos puedan inducir (2), teniendo en cuenta que el marcado efecto inmunestimulante generalmente está relacionado directamente con su toxicidad (3).

Como una nueva alternativa de inmunopotenciación se desarrollan estudios con sistemas acuosos tratados magnéticamente, entre ellos, se demostraron efectos

inmunestimulantes en la solución CM-95 tratada magnéticamente (4-8), lo cual corrobora la sensibilidad del sistema inmune a los efectos del campo magnético (9). Se ha encontrado que la solución CM-95 tratada magnéticamente activa la inmunidad humoral y es mediada por células (4, 6). Estos efectos posibilitaron su uso en la inmunestimulación específica y abren nuevas perspectivas para su aplicación como fármaco inmunopotenciador.

Existe escasa información en la literatura científica sobre los estudios toxicológicos de sustancias tratadas con campo magnético. No obstante, en nuestro país se reporta un estudio de toxicidad e inmunotoxicidad a dosis repetidas, por vía intraperitoneal de la solución CM-95 tratada magnéticamente, en el cual no se evidencian signos de toxicidad local ni sistémica (6), pero aún estos datos son insuficientes para su desarrollo exitoso como fármaco inmunopotenciador.

Es una necesidad completar los estudios toxicológicos preclínicos del candidato a inmunopotenciador, solución CM-95 tratada magnéticamente, que se abordará en este trabajo a través de la evaluación toxicológica por vía oral en ratas Sprague Dawley, luego de la administración repetida a la dosis seleccionada, cumpliendo con el objetivo de establecer las posibles lesiones tóxicas, orgánicas y funcionales que pudieran ser ocasionadas por el candidato a inmunopotenciador.

Materiales y Métodos

Se confeccionaron protocolos de investigación según lo establecido por las normas de la Organización para la Colaboración Económica y el Desarrollo (OECD). La metodología y el diseño experimental cumplen con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y lo establecido en las Guías para el Manejo de Animales de Laboratorio, según el International Council for Laboratory Animals Science (10). El Protocolo del ensayo realizado fue revisado y aprobados por el Comité de Ética institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, y la Unidad de Garantía de la Calidad del Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED).

Sustancia de ensayo

Se preparó una solución formada por los iones cloruro y sodio en agua destilada hasta lograr una concentración en el intervalo de 0,1 y 2% (11). Esta se envasó por filtración y se esterilizó en una autoclave ICEM (Industria Cubana de Equipos Médicos) a 120 °C y a una atmósfera de presión; al producto resultante se le denominó solución CM-95. Luego esta solución se sometió a un tratamiento magnético con una inducción de 0,16 T y a una velocidad de flujo en el intervalo de 0,01-0,4 m/s. El equipo para el tratamiento magnético fue certificado por el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, según las regulaciones internacionales referidas en el certificado N004-001 (Cuba: Avenida de Las Américas S/N Santiago de Cuba 90 400.

G.P. 4078. Cuba). El producto resultante es la solución CM-95 tratada magnéticamente (TM).

Biomodelo experimental

Se utilizaron 30 ratas de la Sprague Dawley (15 hembras y 15 machos), con una edad de 6-8 semanas y un peso corporal de 150-200 g, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana.

Condiciones de alojamiento y alimentación

Las ratas recepcionadas se pasaron a cuarentena, luego se pesaron e identificaron individualmente por perforación y muescas en las orejas (12) y se distribuyeron según tabla de aleatorización (13) en cajas Makrolon modelo 1000. La instalación se mantuvo a temperatura de 22±3 °C humedad relativa de 65% y período luz oscuridad 12 x 12 h. Se utilizó como cama virutas de madera no oleosa, cernida y esterilizada, que se cambió cada tres días. Fueron alimentados con pienso concentrado de la fórmula CMO 1000 multipropósito, convencional procedente del CENPALAB. El agua se administró ad libitum.

Diseño experimental

En la Tabla 1 se muestra el diseño experimental aplicado en el ensayo de toxicidad por dosis repetidas en ratas Sprague Dawley con el candidato a inmunopotenciador solución CM-95 TM.

Tabla 1. Diseño experimental en el ensayo de toxicidad por dosis repetidas en ratas Sprague Dawley del candidato a inmunopotenciador solución CM-95 TM.

Grupos experimentales	Vía de administración	Frecuencia y tiempo de administración	Volumen (mL/g)	Nivel de inducción (T)	Distribución ratas Sprague Dawley	
					Hembras	Machos
GCN				Sin administración del producto	5	5
GTM				0,16	5	5
GS				0,16	5	5

GCN: grupo control negativo. GTM: grupo tratado. GS: grupo satélite.

A los grupos experimentales (GTM, GS) se le administró la solución CM-95 con un nivel de inducción magnética de 0,16 T; la mayor en el rango escogido para tratar esta solución, donde se manifiestan sus efectos inmunoestimulantes y existen más posibilidades de que ocurran daños o muertes.

Las observaciones clínicas se hicieron dos veces al día durante todo el experimento para detectar posibles alteraciones de los animales. El grupo satélite se observó

14 días después de concluida la administración del producto para detectar ocurrencias retardadas, persistencia o recobrado de los posibles efectos tóxicos.

Pesaje del biomodelo experimental

El pesaje de todos los grupos experimentales se realizó los días 0,7 y 14, además de los días 21 y 28 para los del GS en una balanza Sartorius (Sartorius AG; Weander Landstrasse 94-108, 37075 Goettingen, RF Alemania).

Exámenes de laboratorio clínico

Los animales del grupo control y experimental se mantuvieron en ayuno 24 h, después de la última administración del producto (día 14), y se sacrificaron mediante narcosis con Calipsol (Ketamine hydrochloride) inyectable, por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/kg de peso corporal. Aún bajo los efectos del anestésico la sangre se extrajo de la aorta abdominal, según el método de Golbs y Biermann, y se colectó en tubos de ensayo sin heparina para los estudios bioquímicos (glucosa, urea, colesterol, proteínas totales, ASAT y ALAT) y en tubos de ensayo con heparina para la hematología (hemoglobina, leucocitos, hematocrito y conteo diferencial). A continuación se realizó una necropsia completa donde se examinó la superficie corporal, cavidades (craneal, torácica y abdominal) y órganos (corazón, pulmón, hígado, riñones, estómago, intestinos, bazo, timo, encéfalo, ganglios linfáticos y órganos genitales). Se registró también el peso de los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado, riñones, bazo y timo.

Se procesaron histopatológicamente los órganos: hígado, bazo, riñones, ganglios mesentéricos, ovario/testículo, timo, corazón, pulmón, encéfalo y tracto gastrointestinal (estómago, duodeno, yeyuno, ileón y ciego). Los órganos fueron seccionados y dispuestos, y se usó la técnica tradicional de coloración con hematoxilina-eosina al 10%, para su posterior observación y descripción al microscopio óptico Jenamed 2 Carl Zeiss, alemán (14).

Procesamiento estadístico

Se calcularon las Medias y las Desviaciones Estándar de cada variable medida y se realizó un Análisis de Varianza Multivariado Bifactorial, tomando como factores los niveles de dosis y el sexo en cada una de estas características. Este análisis se efectuó con el objetivo de detectar la posible diferencia estadística que podía existir en cada una de las variables en estudio entre los dos factores medidos con una

$p < 0,05$. En el caso de presentarse diferencias significativas entre las medias se aplicó la prueba de Tukey HSD.

Resultados y Discusión

Signos clínicos

El ensayo concluyó con un 100% de supervivencia. En ninguno de los animales tratados se observaron signos clínicos que pudieran asociarse a efectos tóxicos sistémicos; el comportamiento de los animales fue el normal para la especie.

Estos resultados coinciden con los reportados por Martínez y colaboradores en la evaluación de la toxicidad a dosis repetidas e inmunotoxicidad por vía intraperitoneal de la solución CM-95 TM, donde no se observaron cambios en la conducta, ni aparecieron signos clínicos de toxicidad (6). Resultados similares (15) también se obtuvieron en el estudio de toxicidad aguda oral por el método de las clases, donde se registró un 100% de supervivencia, además de obtenerse un comportamiento normal para la especie en todos los animales del estudio.

Se plantea que toda sustancia tóxica produce alteraciones anatomofisiológicas, que se manifiestan en modificaciones en el cuadro clínico general, y estas dependen de la severidad y extensión de la lesión, así como de los sistemas de órganos involucrados, duración de la exposición, cantidad total de la sustancia en sangre, edad y salud general del animal (16).

Los resultados muestran que no hubo manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad durante todo el tiempo que duró el ensayo. Por lo que es posible predecir que la solución CM-95 TM no induce daños asociados a lesiones en sistemas de órganos, que traen por resultado alteraciones en sus funciones.

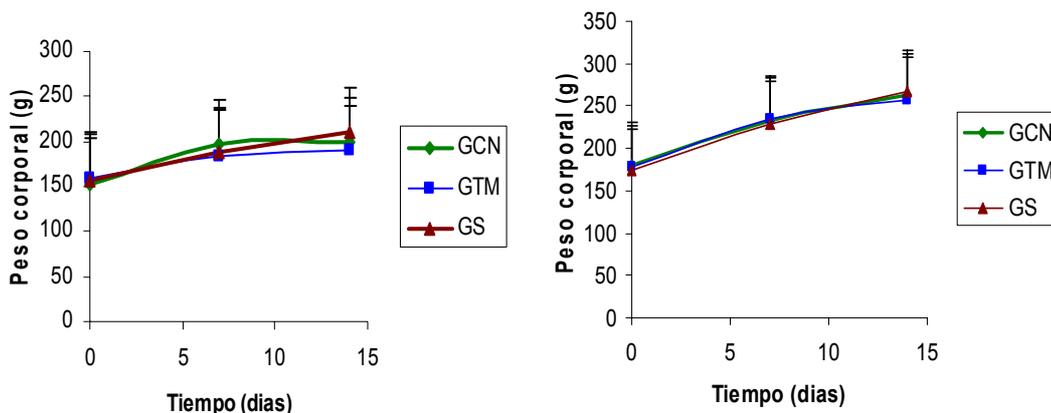


Figura 1. Comportamiento del peso corporal en ratas Sprague Dawley hembras (izquierda) y machos (derecha) expuestas a la solución CM-95 tratada magnéticamente durante el ensayo de toxicidad oral a dosis repetidas por el método del test límite.

Comportamiento del peso corporal

La Figura 1 indica que todas las ratas hembras y machos aumentaron de peso corporal durante el experimento, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sexos, para los tres tiempos evaluados. Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días del ensayo dentro de cada grupo, no así entre los diferentes grupos experimentales ($p > 0,05$).

Los resultados muestran que la tendencia al aumento del peso corporal fue una constante durante el estudio en todos los grupos y sexos (Figura 1). Resultados similares, se obtuvieron en el estudio de toxicidad aguda de la solución CM-95 TM (15). Por otro lado, investigaciones realizadas por Sosa y colaboradores (17), no encontraron alteraciones en el peso corporal de animales tratados, al evaluar el efecto de un sistema acuoso tratado magnéticamente a 100 volt: 2542 Gauss y velocidad de flujo de 1 m/s, incorporado en la dieta diaria de cerdos en ceba. Otros autores en evaluaciones realizadas *in vitro* reportaron que para cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* sometidos al efecto de campos magnéticos variables de alta frecuencia (hasta 100 kHz) y bajas densidades de flujo (hasta 620 mG) se estimula el crecimiento celular con respecto a un cultivo control (18). Algunos científicos han demostrado como efectos biológicos del campo magnético aplicado en diferentes magnitudes y

sistemas biológicos, que se estimula el metabolismo celular y por ende se produce una aceleración en la división celular que produce mayor crecimiento en estos (9, 19). Coincidentemente en este trabajo al aplicar el sistema acuoso tratado magnéticamente en ratas se obtuvo ganancia en su peso corporal, durante su administración. Este comportamiento puede estar relacionado con los efectos biológicos del campo magnético antes explicado.

Varios investigadores coinciden en que los datos referentes al peso corporal, poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos de baja toxicidad (16, 20). Según esta afirmación los resultados obtenidos indican que la exposición subcrónica a la sustancia evaluada no manifiesta toxicidad apreciable en el biomodelo animal empleado.

Parámetros hematológicos

En la Tabla 2 se observa el comportamiento de los parámetros hematológicos estudiados: hemoglobina y conteo total de leucocitos, así como las subpoblaciones leucocitarias: linfocito, polimorfonucleares (neutrófilos) y monocitos en ratas Sprague Dawley, tras la administración oral de la solución CM-95 TM durante 14 días para los distintos grupos experimentales.

Tabla 2. Comportamiento de los parámetros hematológicos (Media \pm S) en ratas Sprague Dawley luego de la administración oral de la solución CM-95 TM a dosis repetidas durante 14 días.

Parámetros	GTM		GCN		GS	
	H	M	H	M	H	M
Hb (g/L)	140,8 \pm 5,40 a	151,6 \pm 2,60 b	144,6 \pm 3,64a	153,8 \pm 2,86 b	142,8 \pm 5,60 a	153,6 \pm 2,80b
Leu ($\times 10^9$ cel/L)	7,0 \pm 1,47 a	6,80 \pm 1,57 a	6,6 \pm 1,08 a	7,14 \pm 1,21 a	6,97 \pm 1,27 a	6,91 \pm 1,59 a
Linfocitos(%)	90,8 \pm 3,83 a	83,6 \pm 1,34 a	83,6 \pm 5,77 a	83,25 \pm 1,45 a	86,3 \pm 3,79 a	83,41 \pm 1,26 a
Neutrófilos(%)	12,25 \pm 0,96 a	16,40 \pm 1,34 b	14,5 \pm 1,28 a	16 \pm 1,41 b	12,25 \pm 0,85 a	16,30 \pm 1,09 b
Monocitos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Eosinófilos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Basófilos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según test de Tukey HSD.

H: hembras, **M:** machos, **GCN:** control, **GTM:** experimental, **GS:** satélite.

En el estudio de las manifestaciones de toxicidad del producto a través de la evaluación de los parámetros hematológicos no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el GTM y GCN, en relación con las determinaciones del contenido de hemoglobina. Sin embargo, en el GTM se observó que los valores de hemoglobina obtenidos para las ratas hembras fue inferior a los machos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sexos. Coincidentemente, se reporta que para esta línea de ratas el comportamiento de

este parámetro en machos muestra valores superiores con respecto a las hembras (21). Por otro lado, se puede apreciar que las diferencias entre sexos también se obtuvieron en el GCN, de lo cual se infiere que las mismas no constituyen manifestaciones de toxicidad.

También se observó un comportamiento similar de este parámetro para el GS con respecto al GTM y GCN, al no mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) con respecto a los mismos. Esto puede indicar que esta solución no produce efectos acumulativos que induzcan a un

proceso de toxicidad después de culminar su administración en el tiempo.

En relación con el conteo total de leucocitos, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes grupos, ni entre los sexos evaluados. Estos resultados difieren de los obtenidos con estudios de esta sustancia administrada por vía intraperitoneal, donde se encontraron diferencias significativas entre los grupos controles y experimentales en el conteo global de leucocitos en sangre periférica (6). Todo parece indicar que la vía de administración empleada puede influir en esta diferencia de comportamiento.

En el análisis del conteo diferencial de leucocitos se obtuvo un aumento de linfocitos en sangre periférica, bajo la acción de la solución CM-95 TM en el GTM con respecto al GCN en las hembras. En los machos, el aumento de estas células fue ligeramente superior sin desviarse de los valores admitidos para las ratas Sprague Dawley (21, 22). En ninguno de estos resultados se presentaron diferencias de significación estadística ($p > 0,05$). Para el GS los niveles de linfocitos se mantuvieron superiores con respecto al GCN, y ligeramente inferiores al GTM, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en ambos casos.

En el conteo diferencial de leucocitos se observa además que para el GTM, los polimorfonucleares (neutrófilos) mostraron valores similares al GCN, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los mismos. Sin embargo, se aprecia que para los machos se obtienen valores superiores a las hembras, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). A pesar de este comportamiento, las diferencias estadísticas entre sexos, no tienen una significación biológica, ya que coincide con lo reportado para esta línea de ratas y se encuentra dentro del rango normal establecido a partir del control (21, 22). Si bien estos resultados a nivel de las células blancas de sangre periférica, no revelan los efectos inmunoestimulantes de la solución CM-95 TM, se ha demostrado que esta induce la migración de estas células desde la sangre periférica hacia compartimentos anatómicos de los órganos comprometidos con la respuesta inmune, lo cual hace variar su conteo una vez que llegan de la médula ósea a la sangre (5, 6). Estos cambios fisiológicos a su vez explican los altos títulos de anticuerpos bacterianos y proteicos que se han obtenido con la solución tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico (4-8). Estas respuestas se han obtenido sin inducir respuestas inflamatorias agudas por daño tisular local, que haga aumentar marcadamente este mediador de la inflamación, como así sucede con otros inmunoestimulantes (23-25).

De estos resultados se infiere que el candidato inmunopotenciador solución CM-95 TM, no induce un proceso inflamatorio local, al verificarse un comportamiento similar en el número de neutrófilos del GTM, con respecto al GCN establecido en este estudio, teniendo en cuenta que

este tipo de leucocito tiende a estar aumentado ante estos estímulos inflamatorios.

Martínez y colaboradores demostraron que la solución CM-95 TM inoculada por vía subcutánea unida a un inmunógeno proteico (en dosis repetidas), no induce la formación de granulomas macrofágicos, como si sucede con el Adyuvante de Freund y otros inmunopotenciadores, pero sí la migración de células blancas hacia el sitio de inoculación y dentro de ellas fundamentalmente linfocitos y macrófagos (7, 8). Estos resultados concuerdan con el mecanismo anteriormente explicado de la solución tratada magnéticamente, sobre las células blancas sanguíneas. En este caso indujo la migración de estas hacia el tejido subcutáneo estimulado por la misma.

En sangre periférica no se encontró variaciones en los valores de monocitos, eosinófilos y basófilos para ninguno de los grupos experimentales utilizados en el estudio, obteniéndose valores normales de estos parámetros en el biomodelo experimental empleado. En general no se observaron alteraciones de significado patológico en la fórmula hemática. Todas las células de la serie blanca observadas al microscopio en el recuento diferencial, se presentaron en fases maduras de su desarrollo, siendo el comportamiento normal de predominio linfocito en todos los animales. La morfología de la serie roja tampoco se encontró alterada, observándose en todos los casos células de tamaño, forma y color característico para la especie.

Parámetros bioquímicos

La Tabla 3 refleja el comportamiento de la bioquímica sanguínea en ratas Sprague Dawley luego de la administración oral de la solución CM-95 TM.

Se observa que los niveles medios de glucosa, urea y colesterol se mantuvieron dentro de los rangos normales. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre grupos ni entre sexos, excepto para los niveles de triglicéridos del GS con respecto al GCN.

Esta diferencia no se relaciona como una manifestación toxicológica por efectos acumulativos, pues los resultados obtenidos para el grupo GS se enmarcan dentro de los valores normales reportados para esta línea de rata. Por otro lado, las manifestaciones asociadas a efectos biológicos significativos en los niveles de triglicéridos se relacionan con el aumento de los mismos y la aparición de la esteatosis hepática, como sucede con diversos tóxicos que producen hígado graso (26-28). Los valores de triglicéridos en el GTM, sugieren que el metabolismo lipídico en las ratas es adecuado.

En el comportamiento del calcio, proteínas totales y albúmina (Tabla 2) obtenidos en el plasma de ratas Sprague Dawley para GTM, GCN y GS, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre grupos ni entre sexos. En todos los casos, se encuentran en el rango de valores normales reportados para esta especie (21, 22).

Sin embargo, los niveles de calcio obtenidos, cuando se administró la solución CM-95 TM durante los 14 días de tratamiento, aunque se ubican dentro de los rangos normales, muestran un ligero aumento en el suero sanguíneo de las ratas hembras y machos del GTM y GS con respecto al GCN. Es significativo que para el GS se obtienen valores

inferiores que para GTM, lo cual sugiere que el aumento se deba a la acción de la sustancia evaluada en el tiempo que fue administrada, y se manifieste de forma reversible luego de suspender su aplicación, con una tendencia a igualarse al valor del GCN.

Tabla 3. Parámetros de bioquímica sanguíneas (Media \pm S) en ratas Sprague Dawley luego de la administración oral de la solución CM-95 TM a dosis repetidas durante 14 días.

Parámetros	GTM		GCN		GS	
	H	M	H	M	H	M
Glucosa (mmol/L)	4,04 \pm 0,25a	4,02 \pm 0,28 a	3,98 \pm 0,14a	3,96 \pm 0,23a	3,97 \pm 0,23a	3,94 \pm 0,21a
Colesterol (mmol/L)	1,51 \pm 0,12 a	1,33 \pm 0,10 a	1,32 \pm 0,08 a	1,53 \pm 0,03a	1,47 \pm 0,10 a	1,30 \pm 0,08a
Triglicéridos (mmol/L)	0,56 \pm 0,018 ab	0,60 \pm 0,017 ab	0,58 \pm 0,018a	0,62 \pm 0,011a	0,54 \pm 0,015 b	0,57 \pm 0,011 b
Calcio (nmol/l)	2,57 \pm 0,02 a	2,59 \pm 0,07a	2,36 \pm 0,47 a	2,42 \pm 0,10a	2,43 \pm 0,02a	2,47 \pm 0,05 a
PT (g/L)	61,9 \pm 7,3 a	61,0 \pm 6,1a	55,5 \pm 2,3 a	58,6 \pm 1,6 a	59,9 \pm 7,1 a	58,0 \pm 5,9 a
Albúmina (g/L)	46,0 \pm 9,3 a	42,9 \pm 4,2 a	44,8 \pm 4,5 a	41,2 \pm 4,1a	45,1 \pm 6,3 a	41,4 \pm 4,2a
Creatinina (mg/dL)	0,36 \pm 0,03 a	0,26 \pm 0,07a	0,30 \pm 0,06 a	0,24 \pm 0,04a	0,36 \pm 0,04a	0,28 \pm 0,07a
Ácido úrico (mg/dL)	1,74 \pm 0,7 a	1,43 \pm 0,3 a	1,83 \pm 0,4a	1,47 \pm 0,4a	1,79 \pm 0,7a	1,48 \pm 0,4a
Bilirrubina (μ mol/L)	4,65 \pm 1,28a	4,08 \pm 0,60 a	4,65 \pm 0,71a	3,57 \pm 0,55a	4,66 \pm 1,24a	4,03 \pm 0,57a
ASAT (U/L)	32,72 \pm 2,08 a	33,46 \pm 3,31a	36,84 \pm 2,62a	34,91 \pm 1,79a	33,82 \pm 2,3a	33,98 \pm 4,0a
ALAT (U/L)	22,7 \pm 2,12a	28,2 \pm 2,73a	23,92 \pm 2,17a	28,91 \pm 2,66a	23,63 \pm 2,43a	29,91 \pm 2,68a
FA (U/L)	32,3 \pm 2,67a	54,14 \pm 6,75b	30,12 \pm 4,88a	49,22 \pm 12,43b	31,7 \pm 2,17a	53,24 \pm 6,45b

Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según test de Tukey HSD. **H:** hembras **M:** machos **GCN:** Control, **GTM:** Experimental, **GS:** Satélite, **PT:** Proteínas totales **ASAT:** Aspartato aminotransferasa, **ALAT:** Alanina aminotransferasa, **FA:** Fosfatasa alcalina.

Coincidentemente Stange y colaboradores (29) reportaron un aumento de estos iones al exterior de las células cuando se aplicó un campo magnético estático. También, Martínez y colaboradores (4) lo demostraron, en el suero sanguíneo, cuando se inoculó la solución CM-95 TM por vía intraperitoneal en ratones Balb/c.

Estos resultados tienen correspondencia con el buen estado fisiológico que se manifestó en los signos clínicos evaluados para este biomodelo experimental durante todo el experimento. La concentración del ión calcio es muy importante para el metabolismo celular, primordial en el funcionamiento de la bomba sodio-potasio, y mediador en la activación de células del sistema inmune entre otros efectos (26, 28).

En los valores de las proteínas totales obtenidos se observa que los grupos GTM y GS estuvieron por encima de los valores alcanzados en el GCN, sin diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$), para hembras y machos. De la

misma forma se demostró que la fracción correspondiente a la albúmina, también se comportó con valores ligeramente superiores para el GTM y GS con respecto al GCN para hembras y machos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Tanto para los valores de albúmina como para los de proteínas totales se observa que el GS presenta niveles inferiores que el GTM, lo cual sugiere que el aumento se deba a los efectos que induce la sustancia evaluada en el tiempo que está en contacto con el organismo, durante el tratamiento. Puede estar relacionado con la actividad inmunoestimulante de la solución CM-95 TM, al activar proteínas que son mediadoras de la respuesta inmune, entre otras funciones (27).

En el comportamiento de la creatinina, ácido úrico y bilirrubina, la Tabla 3 refleja que sus niveles medios se mantuvieron dentro de los rangos normales. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre grupos ni entre sexos.

Los resultados de las enzimas Alanina y Aspartato aminotransferasas, y Fosfatasa alcalina, biomarcadores por excelencia de hepatopatías, causadas por exposición a sustancias químicas, muestran que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos.

Los valores obtenidos de esta enzima en GTM y GS disminuyeron con respecto al GCN en ambos sexos, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Estas diferencias carecen de significación biológica, ya que la actividad de la enzima hepática obtenida se encontró por debajo del rango del valor normal establecido a partir del control, y el valor diagnóstico indicativo de toxicidad se produce cuando sus niveles se encuentran elevados, lo cual puede indicar no sólo hepatopatías, sino afecciones del corazón y músculo esquelético.

Los resultados obtenidos de la Alanina aminotransferasas (ALAT), no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre hembras y machos de los grupos del estudio. Aumentos leves o moderados de la ALAT o la ASAT son no específicos y pueden estar causados por una extensa gama de enfermedades hepáticas (28).

Fosfatasa alcalina (FA), además de ser un indicador de enfermedades óseas, también es un indicador de daño hepático (30). Los resultados obtenidos para esta enzima en el GTM para ambos sexos, estuvieron cercanos a los del

GCN machos y hembras, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Al analizar el GS se observa que el candidato a inmunopotenciador solución CM-95 TM, no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al GTM y GCN, lo cual demuestra que la sustancia objeto de estudio no produjo efectos acumulativos que alteren los valores de la FA establecidos a partir del GCN. Estos resultados se suman a la evidencia de que la solución CM-95 TM no indujo afectación en el funcionamiento hepático en el biomodelo empleado en este estudio.

El análisis de este indicador muestra, además, que para todos los grupos experimentales existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre hembras y machos. Sin embargo las mismas no representan significado biológico dado que se encuentran dentro de los valores reportados para la especie, y se refleja en el comportamiento del GCN establecido en el estudio.

Estudio anatomopatológico

Examen macroscópico

Durante la observación macroscópica no hubo ninguna alteración morfológica en los órganos y tejidos inspeccionados durante la necropsia en los grupos del ensayo. La Tabla 4 refleja el comportamiento de los pesos relativos de los órganos estudiados.

Tabla 4. Peso relativo de diferentes órganos (Media \pm S) en ratas Sprague Dawley luego de la administración oral de la solución CM-95 TM a dosis repetidas durante 14 días.

Órganos	GTM		GCN		GS	
	H	M	H	M	H	M
Bazo	0,0026 \pm 0,0003 a	0,0028 \pm 0,0005 a	0,0026 \pm 0,0001 a	0,0026 \pm 0,0004 a	0,0023 \pm 0,0005 a	0,0021 \pm 0,0002 a
Hígado	0,032 \pm 0,002 a	0,031 \pm 0,001 a	0,033 \pm 0,001 a	0,032 \pm 0,002 a	0,028 \pm 0,001 a	0,026 \pm 0,003 a
Riñón Izquierdo	0,0037 \pm 0,0002 a	0,0040 \pm 0,003 a	0,0040 \pm 0,0002 a	0,0039 \pm 0,0003 a	0,0033 \pm 0,003 a	0,0034 \pm 0,0004 a
Riñón derecho	0,0037 \pm 0,0001 a	0,0039 \pm 0,0004 a	0,0037 \pm 0,0004 a	0,0039 \pm 0,0004 a	0,0035 \pm 0,0004 a	0,0034 \pm 0,0005 a
Timo	0,0031 \pm 0,0005 a	0,0025 \pm 0,0003 a	0,0034 \pm 0,0005 a	0,0025 \pm 0,0003 a	0,0027 \pm 0,0003 a	0,0021 \pm 0,0004 a
Corazón	0,0039 \pm 0,0003 a	0,0037 \pm 0,0008 a	0,0039 \pm 0,0004 a	0,0036 \pm 0,0006 a	0,0035 \pm 0,0008 a	0,003 \pm 0,0006 a
Pulmón	0,0064 \pm 0,0008 a	0,0048 \pm 0,0005 b	0,0065 \pm 0,001 a	0,0057 \pm 0,001 b	0,0065 \pm 0,0005 a	0,0056 \pm 0,0007 b

Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según test de Tukey HSD. H: hembras M: machos GCN: Control, GTM: Experimental, GS: Satélite.

En general, se observa que todos los grupos experimentales exhiben valores cercanos al del GCN, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). No obstante, al comparar entre sexos de cada grupo, se obtienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el peso relativo del pulmón, donde se observan para las hembras valores superiores a los machos. Esto se explica por el mayor peso que reportaron los machos en relación a las hembras durante el experimento, debido a las diferencias biológicas entre ellos. Por tanto, estas diferencias no constituyen una

manifestación de toxicidad, toda vez que las medias correspondientes se hallan dentro del rango normal establecido para esta especie (21). Se plantea que variaciones en el peso relativo de los órganos de los animales tratados, con respecto al grupo control, indican generalmente una toxicidad potencial en dichos órganos (27). Se deduce de lo anteriormente expuesto que la solución CM-95 TM no produjo efectos biológicos dañinos en los órganos evaluados que pudieran afectar este parámetro.

Examen microscópico

En la evaluación histopatológica de los órganos, no se observaron alteraciones de significado patológico en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, en el GTM, en órganos del sistema inmune como ganglios linfáticos y timo, bazo, se observaron cambios microscópicos. En los ganglios linfáticos mesentéricos de este grupo experimental (resultados no mostrados), se

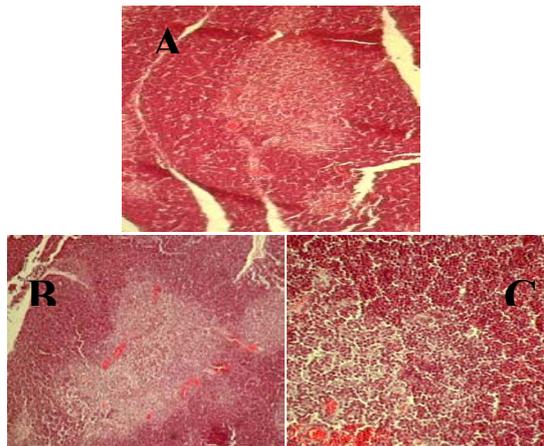


Figura 2. Timo de rata Sprague Dawley (hembra) en el Ensayo de Toxicidad a dosis repetida. **A:** GCN, HE 100 X; **B:** GTM, HE 100 X; **C:** GTM, HE 500 X. Nótese en **B** y **C** pérdida de la de limitación córtico-medular y aumento de la región medular.

Este hallazgo en el examen microscópico es propio de una estimulación de las células hematopoyéticas, producto a la exposición de las ratas Sprague Dawley a la solución CM-95 TM, lo cual ha sido reportado como una propiedad de esta sustancia en estudios realizados (5,6).

Hay que destacar que cuando existe una estimulación de los órganos linfoides, esto se manifiesta por incremento en la celularidad de las áreas que contienen las células inmunocompetentes, en especial los linfocitos (2). Así, en el caso del timo, puede haber un aumento en la densidad de la médula, pudiendo perderse los contornos o la definición entre corteza y médula (31).

En el examen microscópico del bazo que se ilustra en la Figura 3, se observa una ligera hiperplasia de los corpúsculos de Malpighi con pérdida en la delimitación de los mismos. Por tanto se puede apreciar el incremento de la pulpa blanca, que es una zona dependiente de linfocitos, entre otras células que participan en la respuesta inmune. También en los cambios linfáticos hay incremento del tamaño de los folículos (31).

observó un aumento en la celularidad de los folículos linfoides, cuando se administró la solución CM-95 tratada magnéticamente por vía oral.

Por otra parte, en el corte histológico del timo para el GTM, igualmente, hubo un aumento de células en la región medular y ligero predominio de esta con respecto al GCN, principalmente de la serie linfoide con ligera pérdida del límite córtico-medular (Figura 2).

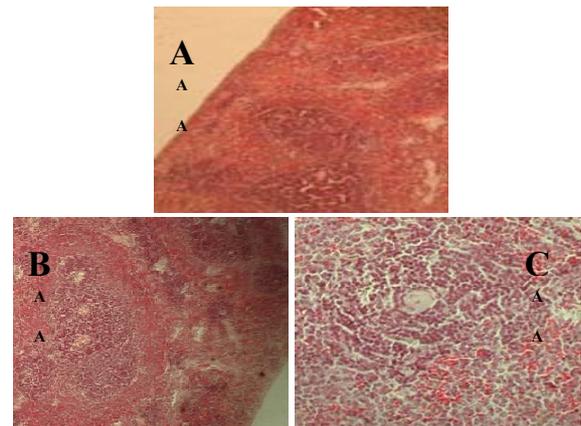


Figura 3. Bazo de rata Sprague Dawley (hembra) en el Ensayo de Toxicidad a dosis repetida. **A:** GCN, HE 100 X; **B:** GTM, HE 100 X; **C:** GTM, HE 500 X. Nótese en **B** y **C** la hiperplasia de los corpúsculos de Malpighi con pérdida de la zona marginal.

La no aparición de modificaciones en otros órganos, y solo la estimulación de órganos del sistema inmune, en compartimientos anatómicos de importancia para los mecanismos de defensa, corroboran las potencialidades de la solución CM-95 TM para la inmunoestimulación, sin hallazgos de valor toxicológico. Coincidentemente este comportamiento fue observado cuando la solución CM-95 tratada magnéticamente se inoculó por vía intraperitoneal (6).

Esta reflexión es importante teniendo en cuenta que si se produce una sobrestimulación del sistema inmune pueden aparecer lesiones orgánicas en riñón, articulaciones, hígado, entre otros, como consecuencia de reacciones de hipersensibilidad o autoinmunes (31, 32). Como se demostró en los órganos estudiados que no mostraron lesiones macro ni microscópicas de valor diagnóstico, corroborando la ausencia de alteraciones bioquímicas y hematológicas.

La solución CM-95 TM se considera potencialmente no tóxica, debido a que en las condiciones ensayadas en el biomodelo animal seleccionado y con el nivel de dosis

utilizado se determinó que la sustancia evaluada no produjo signos clínicos que evidenciaran toxicidad ni muertes en el modelo animal utilizado; tampoco afectó la ganancia del peso corporal de los animales en el ensayo; no produjo alteraciones de valor diagnóstico significativo en los parámetros bioquímicos y hematológicos y no se mostraron alteraciones anatomopatológicas tóxicas, atribuibles al efecto de la sustancia de ensayo, sobre sistemas de órganos y tejidos.

Referencias

- Morris HJ, Martínez CE, Abdala RT, Campos DO. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Inv Biom* 1999;18(2):130-7.
- Edelman R, Tacket C. Adjuvants. *Int Rev Immunol*. 1990;7: 51-66.
- Edelman R. An update on vaccine adjuvants in clinical trials. *AIDS Res Hum Retr*. 1992; 8:1409-11.
- Martínez CE, Portuondo I, 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 de la línea Balb/c por vía intraperitoneal. *VacciMonitor* 1999; 11: 2-5.
- Martínez CE, Cobas G, Lebeque Y, Fontaine R, Pérez I, Morris H, Almenares J. Evaluación de la sustancia CM-95 tratada magnéticamente como inmunopotenciador con antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Biología Aplicada* 2003; 20: 22-25.
- Martínez CE. Efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente sobre biomodelos in vivo e in vitro. Potenciación de la respuesta inmune. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias de la salud. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; 2004.
- Martínez CE, Toledano HM, Rodríguez GS, Andina GL, Carbonell LI. Solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico en la obtención de antisueros humanos poliespecíficos. *Rev Tecnol Quím*. 2007;. Volumen especial: 201-2. (Aceptado a publicación).
- Martínez CE, Tamayo V, Sierra G. Obtención del suero Anti IgG humano con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico. *Medisan [revista electrónica]*. 2007; 11(4).
- Polk CH, Pastow E. Handbook of Biological effects of electromagnetic fields. Boca Ratón. CRC Press I; 1986: 15-39.
- ICLAS. Guideline for Breeding and Care of Laboratory Animals. World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science, (ICLAS); 1998.
- Martínez CE, Rodríguez B, Cobas G, Hurtado A, Pérez I, Correa M. Solución adyuvante. Patente Cubana. Resolución 22583, 1114, 1999 Julio 19.
- Saíz ML, García DE, Osma JL, Compaire FC. Animales de laboratorio. Cría, Manejo y Control Sanitario. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España, 1983: 147.
- ICNMCC. (Instituto Cubano de Normalización, Metrología y Control de la Calidad. Control de la Calidad. Selección de muestras aleatorias. Tabla. NC-92-09. La Habana: ICNMCC, 1975: 1-14.
- Lillie G. Histopatología. Técnicas y prácticas histológicas. [s.l.] Editorial ATIKA; 1995.
- Díaz J, Martínez CE, Alfonso A, Pardo AM, Esmérito J, Puente E, et al [CD-ROM]. Toxicidad aguda oral por el método de las clases de la solución CM-95 tratada magnéticamente en ratas Sprague Dawley. III Simposio Internacional de Química. Santa Clara, Cuba. 5 Junio 2007. ISBN 978-959-250-337-3.
- Hayes W. Principles and methods of toxicology. 2 ed. New York: Raven Press; 1994: 54-8, 188-201, 251-307, 407-33.
- Sosa R, Mederos C, Chao R, Leal M, Alemán E. Tratamiento magnético del agua para cerdos en ceba. Instituto de Investigaciones Porcinas. Disponible en: <http://www.sian.info.ve/porcinas/publicaciones/rccpn/REV33/ROBERTO.htm>. Última actualización 2002. [consulta: 12 mayo 2006].
- Zapata JE, Moreno G, Márquez EJ. Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Cuba. INCI [revista electrónica]. 2002; 27(10). Disponible en: http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_issuetoc&am p. [consulta: 12 mayo 2006].
- Zhadin MN Review of Russian literature on biological action of Dc and low frequency AC magnetic field. *Bioelectromagnetics*. 2001; 22(1): 27-47.
- Porras D, Bacardí D, Aldana L, Merino N, Amaya R, Suárez J, y col. Evaluación toxicológica en ratas Sprague Dawley de Interleuquina-2 y del candidato vacunal FPCR₃, terapia combinada en paciente con SIDA. *Rev Toxicol*. 2004; 21: 31-7.
- Alemán C, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, Gámez R. Reference database for the principal physiological indicators in three species of laboratory animal. *Lab. Anim*. 2000; 34 (1): 358-78.
- Canadian Council on Animal Care (CCAC). Hematology and Clinical Biochemistry Reference Values, In: Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa (Canadá): CCAC Publishing House 1984; T 1: 86-8.
- MINSAP. Formulario Nacional de Medicamentos. Centro para el desarrollo de farmacoe epidemiología. La Habana: Editorial Ciencias médicas; 2006: 173-236, 391-415.
- BOT. Base de datos del medicamento [CD ROM]. Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos. España; 2003.

25. Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. *Inmunología Celular y molecular*. 3 ed. Madrid: Mcgraw-Hill Interamericana; 2000:3-527.
26. Murria RK. *Bioquímica de Harper*. México, DF: Editorial Manual Moderno, 2001: 445 -53.
27. The National academies press. *Subchronic toxicity studies*. E.U.A; 2006: 21-67.
28. Cardellá L, Hernández R. *Bioquímica médica*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias médicas; 2005; t 4: 1119-468.
29. Stange BC, Rowland RE, Rapley BJ. ELF magnetic fields increase aminoacid uptake into *Vicia faba* L. Roots and alter ion movement across the plasma membrane. *Bioelectromagnetics*. 2002; 27(5): 347-54.
30. Repetto MR. *Toxicología Fundamental*. 3ra ed. Barcelona: Editorial Científico-Médica; 2001: 292-97.
31. Selgrade MK. *Immunotoxicity. Bridging the gap between animal research and human health effects*. *Fund. and Applied Toxicol*. 1995; 24: 13- 21.
32. Cruse JM, Lewis RE. *Atlas of Immunology*. 2da ed.: Florida: Taylor & Francis; 2004: 352-390.

Toxicity by repeated dose of magnetically treated CM-95 Solution in Sprague Dawley rats

Abstract

In this study the toxicological evaluation at repeated dose by the method of limit test of the candidate to magnetically treated immunopotentiator CM-95 Solution was carried out; according with regulations of the Organization for Economic Cooperation and Development included in guide 407. The objective was to establish the possible organic and functional lesions caused by the magnetically treated CM-95 Solution with maximum permissible magnetic induction (0,16 T), for obtaining the candidate to immunopotentiator. Three groups were used: Experimental, Control and Satellite. As experimental Biomodels, male and female Sprague Dawley rats were used, with 150 to 200 g weights. During the study neither clinical signs of toxicity nor deaths in any of the animals of the treated groups were registered. There was not affectation of the corporal weight during the test. There was not change of the corporal weight during the trial. Although there were variations of some haematology and biochemical parameters, they had no biological significance. Macroscopic or microscopic lesions were not found; just proliferation effects were observed, in the lymphoid tissues of the thymus and spleen, related to the response of immune system. Magnetically treated CM-95 Solution, showed no toxicity in the animal model and dose level used, and under the observed experimental conditions.

Keywords: Toxicology, repeated dose, magnetically treated CM-95 Solution, Sprague Dawley rats.

Recibido: Abril de 2008

Aceptado: Julio de 2008