

## Efecto inmunomodulador de la solución CM-95 tratada magnéticamente en ratones Balb/c inoculados con 5-fluorouracilo

Clara Martínez<sup>1\*</sup>, Vivian Tamayo<sup>2</sup>, Pedro Favier<sup>3</sup>, José Reynier Castillo<sup>4</sup>, René Hernández<sup>2</sup>, Gustavo Sierra<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente. Avenida de Las Américas S/N. Santiago de Cuba 90 400. G.P. 4078. Cuba. CP 40900.

<sup>2</sup>Hospital Oncológico "Conrado Benítez". Martí y Carretera Central s/n. Santiago de Cuba.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Médicas No. 1. Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>4</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación – Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa. Ciudad de La Habana, Cuba. AP. 16017, CP11600.

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

El 5-fluorouracilo es un antineoplásico usado en la terapia del cáncer y posee acción inmunosupresora al inhibir la proliferación de células del tejido hematopoyético. En este trabajo se evaluó el efecto inmunomodulador de la solución CM-95 tratada magnéticamente en ratones Balb/c inoculados con 5-fluorouracilo a través de su acción protectora rehabilitadora sobre parámetros celulares y tisulares del tejido hematopoyético. A los ratones, entre 20-22 g de peso y 6 semanas de nacidos, se les administró esta solución CM-95 tratada magnéticamente por vía intraperitoneal en un esquema de dos inoculaciones; luego se administró por la misma vía el 5-fluorouracilo a una dosis de 150 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal de cada ratón. Se evaluó el conteo total y diferencial de leucocitos antes de inocular el 5-fluorouracilo, y a los tres y siete días de aplicado este. La celularidad de médula ósea y bazo y la observación microscópica del corte histológico de hígado y bazo por la técnica de inclusión en parafina y tinción con eosina hematoxilina al 10% se evaluaron a los siete días de haber aplicado el 5-fluorouracilo. La solución CM-95, tratada magnéticamente, logró modular los efectos del 5-fluorouracilo con una actividad protectora rehabilitadora, para los parámetros evaluados en médula ósea, sangre periférica, bazo e hígado. Estos resultados abren nuevas perspectivas para la aplicación del sistema acuoso tratado magnéticamente como inmunomodulador.

**Palabras clave:** Inmunomodulación, 5-fluorouracilo, solución CM-95, tejido hematopoyético, ratón.

### Introducción

La oncología moderna posee entre sus objetivos la aplicación de la inmunoterapia a partir de fármacos inmunoestimulantes, combinada con tratamientos convencionales de radio y quimioterapia para el tratamiento del cáncer, entre otros usos. Así es posible lograr la rehabilitación y protección del tejido hematopoyético, vital en el funcionamiento del sistema inmune, que contrarreste los efectos secundarios que inducen estos antimetabolitos. Entre ellos, el 5-fluorouracilo (5-FU) muy utilizado en la quimioterapia del cáncer y con efectos inmunosupresores (1).

Es por ello que la comunidad científica prioriza la búsqueda de nuevas sustancias con actividad inmunoestimulante. Un nuevo enfoque es la evaluación de sistemas acuosos tratados magnéticamente como sustancias inmunopotenciadoras, teniendo en cuenta los efectos biológicos que induce el campo magnético y en específico su acción sobre diferentes componentes del sistema inmune (2-5).

Se han reportado diferentes efectos inmunoestimulantes del sistema acuoso (solución CM-95) tratado magnéticamente (6-8). Sin embargo, aún deben completarse los estudios

preclínicos biológicos que permitan pasar a las fases de su evaluación clínica.

Teniendo en cuenta los aspectos antes planteados, este trabajo tiene como propósito evaluar los efectos inmunomoduladores de la solución CM-95 tratada con campo magnético estático en el intervalo de 0,01-0,16 T y velocidades de flujo entre 0,1-0,5 m/s en ratones Balb/c tratados con 5-FU, a través de sus efectos rehabilitadores protectores sobre parámetros celulares y tisulares del tejido hematopoyético antes, durante y después de la aplicación del 5-FU.

### Materiales y Métodos

#### Biomodelo Experimental

Se utilizaron 15 ratones Balb/c machos, de 20-22 g de peso y 6 semanas de nacidos, distribuidos en tres grupos experimentales con 5 animales cada uno. Estos fueron suministrados por el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX®), de Santiago de Cuba. Los animales se mantuvieron en cajas plásticas en locales asépticos a una temperatura de 22 ± 2 °C y una humedad

\* Dr. en Ciencias de la Salud. Profesor-Investigador. Especialista en Microbiología e Inmunología y Máster en Biotecnología Ambiental.

relativa de 60-65%. Se les suministró agua acidulada a un pH de 2,5-2,8 y pienso ratonina proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB®), ambos *ad libitum*. La metodología y el diseño experimental cumplieron con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y lo establecido en las Guías para el Manejo de Animales de Laboratorio, según el “Internacional Council for Laboratory Animals Science” (9). El Protocolo del ensayo realizado fue revisado y aprobados por el Comité Institucional de Ética para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y la Unidad de Garantía de la Calidad del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.

### Grupos Experimentales

Para determinar los efectos inmunomoduladores de la solución CM-95 tratada magnéticamente en los ratones Balb/c inoculados con el 5-FU, se utilizaron como grupos experimentales, los siguientes:

Un grupo de tratamiento (GTM), donde se aplicó la solución CM-95 tratada magnéticamente y el 5 FU. Como controles, el grupo control positivo (GCP), inoculado con la solución CM-95, sin tratamiento magnético, más el 5- FU y el grupo control negativo (GCN), solo inoculado con solución salina 0,9% (SSF), suministrado por la IMEFA.

### Tratamiento magnético de la solución CM-95

La solución CM-95, formada por una sal inorgánica a una concentración entre 0,1-2%, se hizo pasar por un equipo con imanes permanentes, certificado por el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Se aplicó una velocidad de flujo entre 0,1- 0,5 m/s y una inducción magnética en el rango entre 0,01- 0,16 T (10).

### Determinación de la actividad inmunomoduladora de la solución CM-95 tratada magnéticamente

Para conocer el efecto inmunomodulador de la solución CM-95 tratada magnéticamente se escogieron 5 ratones Balb/c para los grupos GTM, GCP y GCN. Al inicio de los experimentos, para determinar la dosis de 5-FU a administrar por m<sup>2</sup> de superficie corporal, los ratones de todos los grupos experimentales fueron pesados en gramos (g) en balanza Sartorio (Modelo LC62008).

En el esquema siguiente se expone la ruta crítica del experimento. Como se observa, en los grupos GTM y GCP se realizaron dos inoculaciones de la solución CM-95 tratada (GTM) y sin tratamiento magnético (GCP), respectivamente, en un volumen de 0,05 mL por vía intraperitoneal: una al tiempo 0 y la otra a los 120 min de la primera. A los 150 min de la última administración se inoculó el 5-FU por la misma

Tiempo	0	120 min.	150 min.
Dosis	0,05 mL	0,05 mL	150 mg / m <sup>2</sup> superficie corporal
GTM	Solución CM-95 tratada magnéticamente	-	5- FU + SSF
GCP	Solución CM-95 sin tratar magnéticamente	-	5- FU + SSF
GCN	SSF	SSF	SSF (0,1 mL)

vía a los grupos GTM y GCP, con una dosis de 150 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal por cada ratón ajustada en SSF. En el GCN sólo se aplicó SSF en un volumen de 0,1 mL por vía intraperitoneal.

### Evaluación de parámetros hematológicos

La evaluación de los parámetros hematológicos en cada grupo experimental (GTM, GCP y GCN) se realizó a través del conteo total y conteo diferencial de leucocitos en sangre periférica, siguiendo los procedimientos experimentales convencionales (11). Para ello, la sangre de cada ratón se extrajo por el plexo retroorbital antes de inocular el 5-FU y a los tres y siete días posteriores a su aplicación.

Los resultados fueron expresados en 10<sup>9</sup> Células/mL para el conteo total y en por ciento, para el conteo diferencial de leucocitos.

### Celularidad de médula ósea

A los siete días, después de inoculado el 5-FU, los fémur obtenidos de cada ratón se profundieron con 1 mL de suero fisiológico dentro de la zona de diáfisis, para cosechar las células. Estas se centrifugaron a 1800 g durante 10 min en centrífuga IMAG.

El pellet obtenido se resuspendió en 1 mL con 0,5 mL de salina fisiológica y 0,5 mL de medio RPMI 1640 (GIBCO- BRL, E.U). Luego, las suspensiones celulares obtenidas se diluyeron en una proporción de 1:100 en solución fisiológica (IMEFA) y se contaron en cámara de Neubauer, en microscopio OLYMPUS a un aumento de 400X. Para ello, se añadieron 20 mL de cada suspensión en 180 mL de colorante Tripán azul. Los resultados se expresaron como 10<sup>6</sup> células /fémur (12).

### Celularidad del bazo

Los bazos obtenidos a los siete días de iniciado el modelo con 5-FU y después de la necropsia de los ratones en cada grupo experimental, se profundieron con 1 mL de solución fisiológica (IMEFA) para extraer todas las células. Luego, estas se lavaron con la misma solución, por centrifugación a 1800 g durante 10 min en centrífuga IMAG.

Los precipitados obtenidos se resuspendieron en un volumen de 1 mL con 0,5 mL de salina fisiológica y 0,5 mL de suero RPMI 1640 (GIBCO- BRL, EE.UU. Antes del conteo celular en cámara de Neubauer se hicieron

diluciones de las células 1:100, procediendo de la misma forma que para la celularidad de la médula ósea. Los resultados se expresaron como  $10^6$  células / bazo (12).

### Evaluación histológica de órganos

Después de la necropsia de los ratones (siete días después de aplicado el 5- FU), el bazo y el hígado fueron colectados en frascos de boca ancha de color ámbar, adecuadamente rotulados, que contenían solución buffer de formalina al 10%, (MEDICUBA), las primeras 24 horas; luego se transfirieron a una solución menos concentrada al 4% para su conservación. Los tejidos fijados se procesaron en el Histoquinete (Modelo LEYCA-2000); luego se incluyeron en parafina. Los cortes obtenidos se colorearon con hematoxilina eosina HE) al 10% (BDH. La observación microscópica se realizó en un microscopio Olympus (DMLB- CH-2) en inmersión (13-14).

### Análisis estadístico

Para comprobar si los datos cumplían una distribución normal y comprobar la homogeneidad de la varianza se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Bartlett. Para comparar los valores experimentales obtenidos entre los grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Para la comparación de las medias entre los grupos cuando hubo diferencias significativas entre ellos se aplicó la prueba de Tukey. El nivel de significación estadística fue de  $\alpha=0,05$ . Todos los cálculos se efectuaron con el auxilio del programa SPSS para Windows, versión 12.0 (2003).

## Resultados y Discusión

### Parámetros hematológicos antes de inocular el 5-FU

En la Tabla 1 se exponen los resultados en el comportamiento de las variables hematológicas en ratones Balb/c, inoculados con la solución CM-95 tratada magnéticamente (GTM), en comparación con los grupos controles GCP y GCN, antes de inocular el 5- FU. Esta Tabla muestra la superioridad en el número de leucocitos sanguíneos obtenidos en el GTM después de dos inoculaciones de la solución CM-95 tratada

magnéticamente. En este grupo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al GCP y al GCN ( $p<0,05$ ). Entre los grupos controles no hubo diferencias significativas para este parámetro. De la misma forma, en el conteo diferencial de leucocitos hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos del GTM con respecto a los controles (GCP y GCN) ( $p<0,05$ ). Pero estas diferencias no se manifestaron entre los grupos controles ( $p>0,05$ ).

El nivel de polimorfonucleares neutrófilos fue superior para los grupos GCP y GCN, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p>0,05$ ), (con respecto al GTM ( $p<0,05$ ), aunque para los monocitos no se presentaron diferencias significativas entre los grupos.

A pesar de estas variaciones, los valores se mantuvieron dentro del rango normal para la especie. El grupo que fue inoculado con la solución CM-95 tratada magnéticamente, después del tiempo de tratamiento, aumentó el número de linfocitos de sangre periférica. Esto justifica la estimulación que tuvo que sufrir la médula ósea, donde se encuentran las células precursoras hematopoyéticas, en este caso de la serie linfóide. Se obtuvieron resultados similares con la solución CM-95 inoculada con otro esquema de tratamiento, donde se demostró un aumento de la celularidad del bazo, ya que la solución induce a la migración de células de sangre periférica hacia los órganos del sistema inmune (14).

Los factores estimulantes de colonia CSF (Colony-Stimulating-Factor) son citocinas que tienen la capacidad de estimular el crecimiento y desarrollo de colonias de leucocitos, a partir de la médula ósea. Hipotéticamente podría plantearse que los efectos proliferativos promovidos por la solución CM-95 sobre los leucocitos y demostrados en este trabajo, podrían ser posibles por la acción que esta solución tratada magnéticamente pudiera inducir sobre estas citocinas (15).

Los resultados obtenidos avalan la estimulación del sistema hematopoyético y fundamentalmente de células blancas de la sangre en los ratones Balb/c, después de inoculados con la solución CM-95 tratada magnéticamente. Estos poseen mejores condiciones para recibir posteriormente el 5-FU que

**Tabla 1.** Conteo total y diferencial de leucocitos en ratones Balb/c antes de la aplicación del 5-FU y con la solución CM-95 TM n=5.

Parámetros Hematológicos	GTM*	GCP**	GCN***
Leucocitos ( $10^9$ células/l)	a 5,9 ± 0,50	b 5,08 ± 0,63	b 5,04 ± 0,5
Linfocitos (%)	a 55,2 ± 5,2	b 44,8 ± 3,36	b 49,0 ± 5,61
Neutrófilos (%)	b 41,6 ± 2,19	a 48,8 ± 6,26	a 53,5 ± 4,43
Monocitos (%)	a 1,6 ± 2,19	a 0,0	a 1,6 ± 3,48

\*Solución CM-95 tratada magnéticamente y el 5- Fu

\*\* Solución CM-95 sin tratar magnéticamente y el 5- Fu

\*\*\* SSF 0,9% (Solución Salina Fisiológica )

Letras diferentes por filas denotan diferencias significativas (  $p<0,05$  ). Prueba de Tukey.

los controles donde solo se inoculó solución CM-95 sin tratamiento magnético.

### Parámetros hematológicos después de tres días de inoculado el 5-FU

Los valores hematológicos relacionados con el conteo total y diferencial de leucocitos obtenidos en ratones Balb/c para los grupos experimentales GTM, GCP y GCN, tres días después de haber inoculado el 5 – FU se exponen en la Tabla 2.

Los valores medios en el conteo total de leucocitos de los grupos GTM y GCN arrojaron un aumento del número de células blancas, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ). Ambos grupos presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control positivo GCP ( $P < 0,05$ ).

Al analizar el conteo diferencial de leucocitos se observó que en el grupo GTM se registraron los mayores valores ( $p < 0,05$ ). A su vez, el GCN mostró valores superiores con respecto al grupo control positivo (GCP), ( $p < 0,05$ ). Para los neutrófilos no hubo diferencias significativas entre el GTM y el GCP ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, ambos grupos exhibieron valores de neutrófilos inferiores al GCN. En este caso, el GCN mostró diferencias significativas con relación a ambos grupos: GTM

y GCP ( $p < 0,05$ ). El conteo de monocitos no presentó diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0,05$ ).

### Parámetros hematológicos después de siete días de inoculado el 5-FU

En la Tabla 3 se exponen los valores hematológicos para el conteo total y diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratones Balb/c en los grupos GTM, GCP y GCN, siete días después de haber inoculado el 5-FU.

El nivel de leucocitos para el grupo donde se aplicó la solución CM-95 tratada magnéticamente (GTM) fue similar a los obtenidos en el GCN ( $p > 0,05$ ). En el GCP los valores de las células blancas fueron inferiores a los otros grupos ( $p < 0,05$ ). El conteo de linfocitos se mantuvo superior en el grupo GTM ( $p < 0,05$ ). Los polimorfonucleares neutrófilos fueron superiores para los grupos GCP y GCN, con respecto al GTM ( $p < 0,05$ ). No se detectaron diferencias significativas para los monocitos.

Como se observa, los efectos de la solución CM-95 tratada magnéticamente permitieron que los ratones lograran buenos niveles de leucocitos de sangre periférica después de siete días de aplicado el 5-FU. Aunque el número de linfocitos disminuyó en el conteo diferencial, con respecto a los tres días después de su aplicación (14).

**Tabla 2.** Conteo total y diferencial de leucocitos en ratones Balb/c a los tres días de inoculados con el 5-FU y la solución CM-95 TM n=5.

Parámetros Hematológicos	GTM*	GCP**	GCN***
Leucocitos ( $10^9$ células/l)	a 6,34 ± 0,53	b 3,96 ± 0,61	a 5,84 ± 0,34
Linfocitos (%)	a 71,2 ± 7,15	c 37,6 ± 3,46	b 49,6 ± 3,85
Neutrófilos (%)	b 28,2 ± 8,01	b 20,6 ± 3,85	a 46,4 ± 3,68
Monocitos (%)	a 0,8 ± 1,79	a 0,0	a 0,8 ± 1,78

\* Solución CM-95 tratada magnéticamente y el 5- Fu

\*\* Solución CM-95 sin tratar magnéticamente y el 5- Fu

\*\*\* SSF 0,9% (Solución Salina Fisiológica)

Letras diferentes por filas denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Prueba de Tukey.

**Tabla 3.** Conteo total y diferencial de leucocitos en ratones Balb/c a los siete días de inoculados con el 5-FU y la solución CM-95 TM n=5.

Parámetros Hematológicos	GTM*	GCP**	GCN***
Leucocitos ( $10^9$ células/l)	a 6,14 ± 0,49	b 4,5 ± 0,49	a 5,74 ± 0,41
Linfocitos (%)	a 59,2 ± 1,79	b 47,6 ± 6,98	b 50,4 ± 4,56
Neutrófilos (%)	b 38,4 ± 3,58	a 52,8 ± 6,56	a 49,6 ± 4,56
Monocitos (%)	a 2,4 ± 3,58	a 1,6 ± 2,19	a 0,0

\* Solución CM-95 tratada magnéticamente y el 5- Fu

\*\* Solución CM-95 sin tratar magnéticamente y el 5- Fu

\*\*\* SSF 0,9% (Solución Salina Fisiológica)

Letras diferentes por filas denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Prueba de Tukey.

Se observa un aumento de los polimorfonucleares neutrófilos para el GTM, con respecto a los tres días de aplicado el 5-FU, pero es más significativo para el control con el 5-FU (GCP), quien se acercó más rápido al valor del GCN a este tiempo y superó sus valores. Sin embargo, el nivel de linfocitos es mucho más bajo que en el grupo GTM, donde también se aplicó el 5-FU.

El aumento significativo de neutrófilos que experimentó el GCP, podría explicarse teniendo en cuenta que a los siete días de aplicado el 5-FU, ya las células recibieron los efectos del producto químico que se ha metabolizado y biodegradado. Producto de ello pudo inducir efectos inflamatorios, aumentando la proliferación de los neutrófilos, más que el efecto bloqueador de la síntesis del ADN que produce en los primeros días de su inoculación. Los neutrófilos aumentan en número en los procesos inflamatorios y coincidentemente la literatura científica plantea que el 5-FU se mantiene en sangre después de 7 días, manifestando su toxicidad a través de efectos inflamatorios y cambios fisiológicos, fundamentalmente en el sistema digestivo (16).

Se conoce por numerosos estudios experimentales y de aplicación clínica que el 5-FU en su metabolismo puede producir deficiencia en la timidina y provocar desequilibrio en la división y crecimiento celular. El 5-FU bloquea la reacción de metilación que conduce al ácido desoxiuridílico y al ácido desoxitimidílico con consecuencias en las bases púricas (timidina) y de esa manera interfiere la síntesis de ADN y la formación del ARN en el proceso de transcripción.

Este efecto es más evidente en las células de rápida división y crecimiento, quienes deben captar más rápidamente el 5-FU. Precisamente las células tumorales y de la médula ósea donde se origina el tejido hematopoyético, son las más afectadas. Por lo que si las células del sistema inmune se originan en la médula ósea también el 5-FU las afecta produciendo procesos de inmunosupresión a este nivel (16). Todo parece indicar que en los ratones, al recibir la solución CM-95 tratada magnéticamente antes del 5-FU y tres días después de la aplicación de este, se estimuló la celularidad de la médula ósea, donde se encuentran los precursores de las células hematopoyéticas, que luego van hacia la sangre periférica.

Este comportamiento puede justificar el aumento del número de linfocitos para el GTM, con respecto al GCP, antes de la inoculación y durante la inoculación del 5-FU. En este caso, la sustancia tratada magnéticamente no permitió que se manifestara el efecto bloqueador que produce el 5-FU en la síntesis del ADN de linfocitos al mismo nivel que cuando se aplicó la salina fisiológica.

La solución CM-95 tratada magnéticamente posiblemente estimuló la multiplicación de los precursores linfoides en mayor medida y por encima de los niveles normales. Así su tasa de mitosis, que normalmente es elevada, se pudo

incrementar aún más, aumentando a su vez el número de células que entran en mitosis con el aumento en la síntesis del ADN.

Existen reportes de los efectos proliferativos de la solución CM-95 tratada magnéticamente en las células de la médula ósea, como ya ha sido discutido (8). Por otro lado, también se reportan efectos estimulatorios del campo magnético en la biosíntesis del ADN (17).

El comportamiento obtenido en los polimorfonucleares neutrófilos presupone que aún se expresa el efecto bloqueador inducido por el 5-FU en este tiempo (tres días), después de aplicado en los grupos GTM y GCP, siendo más marcado en este último.

En este caso, la solución tratada magnéticamente (GTM), logró mantener un número mayor de neutrófilos en sangre periférica después de tres días de aplicado el 5-FU, con respecto al GCP; aún cuando antes de aplicar este sus valores eran inferiores a los del GCP. Solo los valores de estas células disminuyeron con respecto al control donde no se aplicó el 5-FU (GCN). Por lo que, la solución CM-95 tratada magnéticamente pudo contrarrestar en mayor medida el efecto esperado del 5-FU sobre los neutrófilos.

La literatura científica señala que una de las células del tejido hematopoyético más afectada por la acción del 5-FU es el polimorfo nuclear neutrófilo, además de los linfocitos y monocitos (12,16). Sin embargo, los monocitos fueron las células menos afectadas después del tratamiento con el 5-FU, en el GTM y GCP.

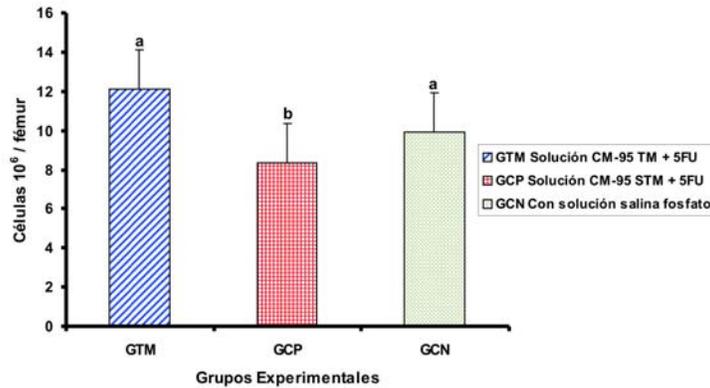
Se reportó que ratones tratados con el extracto de *Trichilia hirta*, en varias dosis, y cuatro días después de aplicar el 5-FU, se produjo un aumento de los neutrófilos por encima de los valores obtenidos en los controles (12). Sin embargo, hubo una disminución del número de linfocitos en sangre periférica, con valores inferiores a los controles.

Estos resultados indican que cada sustancia en particular posee efectos diferentes frente a sustancias inmunosupresoras, de acuerdo con la acción inmunoestimulante que la caracteriza.

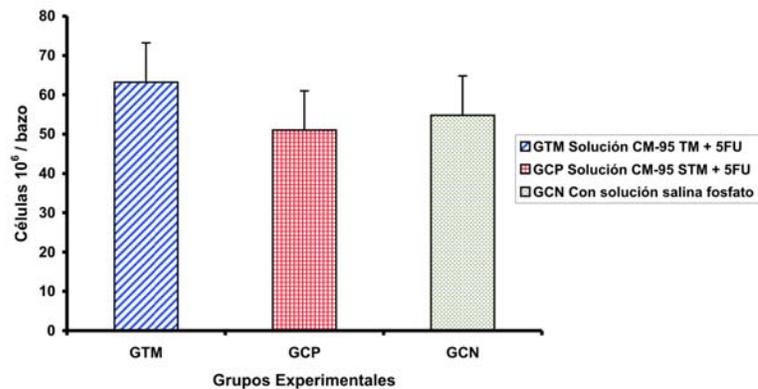
### **Celularidad de médula ósea a los siete días de inoculado el 5-FU**

La celularidad de la médula ósea se registra en la Figura 1 para los grupos experimentales GTM, GCP y GCN, después de haber aplicado el 5-FU. En los valores medios de este indicador se presentaron diferencias significativas solo entre el GTM y el GCN, con relación al GCP ( $p < 0,05$ ).

Con estos resultados se puede constatar la acción estimulante de la solución CM-95 tratada magnéticamente sobre las células hematopoyéticas. Es evidente que posee



**Figura 1.** Celularidad de médula ósea en ratones Balb/c a los siete días de inoculados con el 5-FU y la solución CM-95 TM n=5. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Prueba de Tukey.



**Figura 2.** Celularidad de bazo en ratones Balb/c a los siete días de inoculados con el 5-FU y la solución CM-95 TM n=5. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Prueba de Tukey.

un potencial para estimular la proliferación de estas células a nivel de la médula ósea.

Sin embargo, este comportamiento no fue igual para el GCP, donde también se aplicó el 5-FU después del tratamiento con la misma solución sin tratamiento magnético. En este caso, se manifestaron de forma marcadas los efectos de este inmunosupresor, lo cual afectó el número de células de la médula ósea, en mayor medida para este grupo experimental y fueron más evidentes los efectos antes señalados.

Como la literatura plantea, la médula ósea es un órgano primario que asume la función de originar el tejido hematopoyético. En su estructura reticular da origen a los precursores de las células de la sangre, quienes maduran y a través de la densa red de senos vasculares desembocan en el sistema circulatorio.

Así es posible que las células sanguíneas lleguen a la sangre y los tejidos. Cualquier estímulo que afecte la celularidad de la médula ósea afecta el comportamiento de las células hematopoyéticas en la sangre y los tejidos (15). Estos aspectos están en concordancia con los resultados obtenidos en el conteo total y diferencial de leucocitos en los grupos

experimentales evaluados a diferentes tiempos después de aplicado el 5-FU.

### **Celularidad de Bazo a los siete días de inoculado el 5-FU**

En la Figura 2 se exponen los resultados de la celularidad del bazo de los ratones Balb/c para los grupos GTM, GCP y GCN, después de siete días de inoculado el 5-FU.

La media obtenida en el grupo GTM fue superior al alcanzado en los grupos GCN y GCP ( $p < 0,05$ ). Como era de esperar, los valores más altos en la celularidad del bazo se obtuvieron para el GTM, donde se aplicó la solución CM-95 tratada magnéticamente junto al 5-FU. En otras condiciones experimentales de tratamiento (14), demostraron por evaluación histológica que la solución CM-95, tratada magnéticamente, aumenta de forma significativa la celularidad del bazo.

El hecho de que para el GCP este parámetro fuera inferior con relación a todos los grupos y se acercara a los valores del control negativo, es una evidencia de que la movilización de células hacia este órgano no es estimulada por la solución

CM-95 sin tratamiento magnético unida al 5-FU, de la misma forma que lo hace la solución tratada magnéticamente. A su vez, este comportamiento puede ser el resultado de la estimulación obtenida en la médula ósea en este tiempo para el GCP.

El bazo filtra la sangre, incorporando a sus compartimentos estructurales las células sanguíneas que se han formado en la médula ósea. Por tanto, su celularidad depende en gran medida del comportamiento de la médula ósea (15).

### Observación microscópica de órganos a los siete días de inoculado el 5- FU

#### Observación histológica del bazo

En la Figura 3 se exponen los resultados de la observación microscópica efectuada en los cortes histológicos del bazo en ratones Balb/c de los grupos GTM, GCP y GC.

Como se puede observar en la Figura 3, para el corte histológico del bazo de los tres grupos experimentales se distinguen de forma diferenciada la morfología de la pulpa blanca de este órgano. En el grupo control negativo (3A) se observan los corpúsculos de Malpigio, con centros claros de tamaño pequeños o sin ellos, en toda la zona de la pulpa blanca. También, la zona marginal que rodea a estos aparece celularidad normal.

En el grupo GCP (3B) con la solución CM-95 sin tratamiento magnético y el 5- FU se observaron cambios en la morfología de la pulpa blanca, con disminución marcada en el tamaño de los corpúsculos de Malpigio, quienes aparecen agrupados hacia el centro de la pulpa blanca. Además, escasa población celular, sin precisarse la zona marginal, así como la aparición de cambios en la coloración del tejido.

En el GTM (3C), donde se aplicó la solución tratada magnéticamente junto al 5-FU en la zona de la pulpa blanca, se observan los corpúsculos de malphigio con centros claros y la zona marginal que los rodea bien definida, con celularidad normal.

En estos resultados se pueden observar los efectos de la sustancia tratada magnéticamente (GTM), quien pudo estimular la migración de células de la sangre hacia el bazo, sin que se produjeran los cambios morfológicos, que induce el 5-FU. Precisamente, por los efectos inmunoestimulantes de esta solución tratada magnéticamente, fue posible una buena recuperación del entorno anatómico del bazo (pulpa blanca), a pesar de los efectos antiproliferativos que induce este citostático.

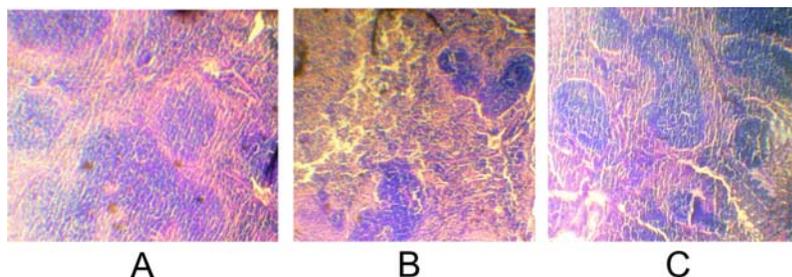
En contraste con estos resultados en las muestras histológicas del bazo en el grupo GCP, se corroboraron los efectos del 5- FU, al inducir pérdida en la arquitectura de los corpúsculos de Malpigio y de la pulpa blanca con despoblación celular. Estos resultados concuerdan con los ya obtenidos (12), al evaluar la acción inmunoestimulante de extractos de *Trichilia hirta*, en un modelo con el mismo citostático.

Como ya se ha planteado, el bazo es un órgano hematopoyético, pero a la vez cumple funciones importantes en la respuesta inmune. En sus corpúsculos de Malpigio se sintetizan anticuerpos, por lo que es una vía para garantizar la inmunidad humoral, donde participan, además, linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas. Como se aprecia, la solución CM-95 tratada magnéticamente protegió la arquitectura histológica del bazo, a pesar de haberse inoculado un inmunosupresor que induce cambios en ella, lo cual puede afectar el entorno adecuado para la respuesta inmune.

#### Observación histológica del hígado

Los cortes histológicos de los hígados para los grupos GCN (4D), GCP (4E) y el GTM (4F) a los siete días de haber inoculado el 5-FU y la solución CM-95 TM en comparación con los grupos controles se exponen en la Figura 4.

En el corte histológico del hígado para el GCN (4D) se observan hepatocitos de alta actividad mitótica, buena irrigación sanguínea del órgano y ligera congestión

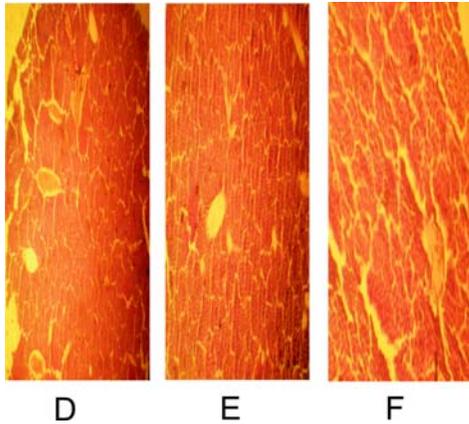


**Figura 3.** Observación microscópica del bazo en ratones Balb/c a los siete días de inoculados con el 5-FU y la solución CM-95 TM A-(GCN), B-(GCP) y C-(GTM) H.E. 400 x.

GCN (3A) Corte histológico de bazo en animales inoculados con SSF 0,9%. H.E 400X.

GCP (3B). Corte histológico del bazo en animales inoculados con la solución CM-95 sin tratar magnéticamente y el 5 FU. H.E. 400X.

GTM (3C). Corte histológico de bazo en animales inoculados con la solución CM-95 tratada magnéticamente y el 5-FU H.E 400X.



**Figura 4.** Observación microscópica del hígado en ratones Balb/c a los siete días de inoculado el 5-FU y la solución CM-95 TM (F- GTM), en comparación con los controles D-GCN1, E-GCP. H:E. 400X.

GCN (4D). Corte histológico del hígado en ratones inoculados con SSF al 0,9%. H.E 400X .

GCP (4E). Corte histológico de hígado en ratones inoculados con la solución CM-95 sin tratamiento magnético y el 5-Fu. H.E 400X. GTM (4F). Corte histológico de Hígado en ratones inoculados con la solución CM-95 tratada magnéticamente y el 5-FU. H.E. 400X.

sanguínea. En el GCP (4E), aunque se observan los hepatocitos con actividad mitótica, hay poca irrigación sanguínea, con cambio de coloración del tejido y células de menor tamaño.

Para el GTM, (4F) las células hepáticas se observaron normales, con alta actividad mitótica y buena irrigación sanguínea del órgano, lo cual denota congestión sanguínea. También se observa un ligero infiltrado linfocitario periportal.

Este comportamiento diferenciado en el GCP con respecto a los otros grupos, puede explicarse por los efectos del 5-FU, quien produce destrucción de los eritrocitos, además de los efectos antiproliferativos, ya discutidos, para otras células del tejido hematopoyético (16). En este caso, para el GTM también a nivel de este órgano se observa la acción protectora de la solución CM-95 tratada magnéticamente frente al 5-FU.

Diferentes autores han reportado la acción del campo magnético en el aumento del flujo sanguíneo (2), lo cual podría explicar este comportamiento histológico obtenido en el GTM. Aunque este efecto también se observó en el GCN, cuando se utilizó la solución salina sin el 5-FU, lo que podría justificarse ya que el hígado es un órgano con irrigación sanguínea alta.

En sentido general, los resultados para el grupo tratado GTM son muy similares al GCN, indicando que ya a los siete días en el GTM hay un efecto rehabilitador del tejido hepático, aún cuando pueden manifestarse efectos secundarios del 5- FU a este tiempo, como sucedió para el GCP.

Al seguir la dinámica en el comportamiento de los parámetros celulares y tisulares del tejido hematopoyético evaluados en

este trabajo, se ha podido demostrar que la solución CM-95 tratada magnéticamente (GTM) logró la rehabilitación de células blancas de la sangre con su actividad proliferativa de la médula ósea, fundamentalmente para las estirpes linfoides, aún cuando se aplicó el 5-FU. Resultado que contrasta con el obtenido para el GCP, donde se utilizó la misma solución sin tratamiento magnético más el 5- FU.

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la actividad inmunoestimulante de la solución CM-95 tratada magnéticamente ya reportada anteriormente (6-8, 18-20), y con efectos protectores y rehabilitadores sobre diferentes componentes del tejido hematopoyético de ratones Balb/c tratados con el inmunosupresor 5- FU.

## Referencias

1. Ignacio Melero. Desarrollo de nuevas estrategias moleculares de inmunoterapia frente a enfermedades malignas. Simposio Internacional de Inmunología e Inmunoterapia del Cáncer; 2007 enero 16-17. Pamplona, España: Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra, Fundación Ramón Areces; 2007.
2. Klassem VJ. Magnetización de sistemas acuosos. Moscú: Editorial Química;1982 .
3. Polk C, Pastow E. Handbook of Biological. Effects of Electromagnetic Field. Boca de Ratón. CRC: Edition Press II; 1986.
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. Manni V, Antonella L, Pozzi P, Riete S, Serafino A, Grimaldi S. Effects extremely low frequency 50 Hz magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes. Bioelectromagnetics 2002;23(4):298-315.
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 1999;8 (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*. Biotecnología Aplicada 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. Biotecnología Aplicada 2004;21:224-8.
9. 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. p. 86-8
10. Martínez CE, Rodríguez B, Cobas G, Hurtado A, Pérez I, Correa M. Solución adyuvante. Patente Cubana CU 22583, 114.1999. Julio 19.

11. Colina JA, Álvarez RE, Celso Rc, Ballester JS, Ballester SA, Hernández G, et al. *Laboratorio*. Tomo I. Ciudad de La Habana: Editorial Pueblo y Educación;1989.
12. Hernández SE. Efecto del extracto acuoso de *Trichilia hirta* en la mejoría de pacientes neoplásicos [Trabajo de Diploma]. Departamento Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba; 2004.
13. Infante JF, Pérez PS, Infante JF. *Neisseria meningitides*. Resultados experimentales sobre los biomodelos de rata ratón. Monografía F. D. Ciudad de La Habana: Editorial Finlay Ediciones; 1996.
14. Díaz BJ, Martínez CE, Alfonso CA, Pardo TA, Esmérito BJ, Salas MH, Et al. Evaluación de la toxicidad aguda oral e irritación sobre mucosa bucal de la Solución CM-95 tratada magnéticamente. *Acta Toxicol* 2008;16(2):34-40.
15. Abbas Ak, Lichman AH, Pober JS. *Inmunología Celular y Molecular*. 3<sup>ra</sup> edición. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
16. Anónimo 1.5- fluorouracilo. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/5-fluorouracilo>. [Consultado: 15 Diciembre, 2009].
17. Blank M, Goodman R. Do electromagnetic field interaction directly with DNA? *Bioelectromagnetics* 1997;18:111-5
18. Rodríguez B, Correa M, Hurtado A. Efectos del tratamiento magnético del agua y Soluciones acuosas. *Rev Cub Quím* 1998;10 (3):1-2.
19. Martínez MC, Tamayo O V, Sierra GG. Obtención del suero anti IgG humano con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico. *MEDISAN* 2007;11(4). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11\\_4\\_07/san09407.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_4_07/san09407.htm) [consultado: Junio, 2009].
20. Martínez CE, Toledano M, Rodríguez G, Keagne A, Iztiz L, Sierra G. Solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente en comparación con el adyuvante de Freund para la obtención del suero de Coombs en conejo. *Vaccimonitor* 2009;18(3): 5-12.

---

## **Immunomodulator effect of the CM-95 Solution treated magnetically in Balb/c mouse with 5- fluorouracil inoculated**

### **Abstract**

5-Fluorouracil is an antineoplastic drug used in cancer chemotherapy. It has immunosuppressant effects by inhibiting cell proliferation from the haematopoietic tissue. In this paper, the immunomodulating effect of the magnetically treated CM-95 solution in Balb/c mice inoculated with 5- fluorouracil by its rehabilitating protecting action on cell parameters of the haematopoietic tissue. Six-week old mice weighing 20-22 g were inoculated twice with magnetically treated CM-95 solution by intraperitoneal route. Then, they received 5-fluoracile in a dose of 150 mg/m<sup>2</sup> of body surface by the same route. Haematopoietic parameters such as total and differential leukocyte count were evaluated before applying the antineoplastic drug and at the third and seventh days after the application. Bone marrow and spleen cellularity as well as the microscopic observation of the histological cut of the liver and of spleen, by the technique of inclusion in paraffin dyes with 10% eosin haematoxylin, were evaluated at seven days after the application of 5 fluorouracil. The magnetically treated CM-95 solution could modulate the effects of 5-fluorouracil with protecting and rehabilitating activity for the parameters evaluated in the bone marrow, peripheral blood, spleen and liver. These results open new perspectives for the application of the magnetically treated aqueous system as immunomodulator.

**Keywords:** Immunomodulation, 5 Fluorouracil, CM-95 Solution, haematopoietic tissue, mice.

---

*Recibido: Julio de 2010*

*Aceptado: Septiembre de 2010*