

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA E INMUNOMODULADORA DEL IÓN
CLORITO (ClO_2^-) ACTIVADO, POPULARMENTE LLAMADO
“MILAGROSO SUPLEMENTO MINERAL”**

PEDRO PABLO MARTÍNEZ ROJAS

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, MAYO DE 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA E INMUNOMODULADORA DEL ION
CLORITO (ClO_2^-) ACTIVADO, POPULARMENTE LLAMADO
“MILAGROSO SUPLEMENTO MINERAL”**

**Informe de Tesis
Presentado por**

PEDRO PABLO MARTÍNEZ ROJAS

Para optar al título de

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, MAYO DE 2014

JUNTA DIRECTIVA

Óscar Manuel Cóbar Pinto, PhD.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Núñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A la Santísima Trinidad, por sus obras manifiestas en mi vida.

A la Santa Señora, la Inmaculada Concepción, por sus respuestas constantes.

A mis papás, Marta Alicia Rojas y Oswaldo Efraín Martínez, por su amor y apoyo. Son el todo para mí: mis decisiones las he tomado siempre con ustedes en mente.

A la Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez, por su amor y presencia permanente. Los ángeles existen: gracias por recibirme siempre con los brazos abiertos, por levantarme y guiarme.

A mis amores, las licenciadas Isabel Gaitán, Keila Guerrero y Dayrin Ortiz, por ser siempre luz.

A José Javier Bonilla, mi gran amigo desde el colegio.

A la Licda. Blanca Samayoa, por su apoyo y enseñanzas diarias. Gracias por verme cuando me sentía invisible, por darme la mano cuando estaba perdido.

A mis maestras de vida, las licenciadas Karla Lange, María Eugenia Paredes, Ana Rodas, Irma Juárez, María Teresa Meneses e Ingrid Tabarini, por creer en mí y darme oportunidades.

A la Dra. Dalia Lau-Bonilla y las licenciadas Tamara Porta, Danicela Mercado, Anneliese Moller, María Inés Herrarte, Lucía Roesch, Lucía Herrera y Aliz Pérez, por compartir la vida.

A la Licda. Ana Isabel Mansilla, por mostrarme el camino.

Al Dr. Estuardo Estrada-Mayorga, por ser mi voz en los momentos de confusión.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Escuela de Química Biológica, por el conocimiento.

Al Departamento de Citohistología, Laboratorio de Bioensayos, por todas las facilidades para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo de la Asociación de Salud Integral.

Al Laboratorio Clínico, Área de Microbiología, del Hospital Herrera Llerandi.

I. ÍNDICE

	Página
II. Resumen	8
III. Introducción	9
IV. Antecedentes	10
A. Toxicidad celular	10
1. Mecanismos de toxicidad celular por fármacos	10
2. Lesión y muerte celular	11
a. Definición	11
b. Mecanismos para la lesión celular	11
c. Rutas de señalización y tipos de lesión celular	12
i. Apoptosis y oncosis	12
ii. Necrosis	13
B. Inmunotoxicología e inmunomodulación	14
1. Sistema inmunológico	14
2. Respuesta inmune innata	15
3. Respuesta inmune adquirida	15
4. Inflamación	15
5. Mecanismos humorales y componentes celulares de la respuesta inmune innata	18
6. Mecanismos humorales y componentes celulares de la respuesta inmune adquirida	18
7. Mecanismos de regulación de la respuesta inmune	20
8. Inmunotoxicología	20
9. Inmunomodulación	21
C. Ion clorito activado	22
1. Definición química	22
2. Usos y aplicaciones actuales	23
3. Toxicidad	24
4. Ion clorito activado: “Milagroso Suplemento Mineral”	24
V. Justificación	26

VI. Objetivos	27
VII. Hipótesis	28
VIII. Materiales y Métodos	29
A. Universo y muestra	29
1. Universo de trabajo	29
2. Muestra	29
B. Recursos Humanos	29
1. Investigador	29
2. Asesora	29
3. Revisoras	29
C. Recursos Institucionales	29
D. Materiales	29
1. Equipo	29
2. Reactivos	30
3. Agentes biológicos	31
4. Materiales	31
E. Metodología	32
1. Preparación de la solución ion clorito activado	32
2. Actividad citotóxica contra <i>Artemia salina</i>	33
3. Actividad antimicrobiana: bacterias	34
4. Actividad antimicrobiana: levaduras	35
5. Actividad antimicrobiana: concentración inhibitoria mínima (CIM)	36
6. Ensayo linfoproliferativo	37
7. Ensayo hemolítico para evaluar actividad del complemento	39
F. Diseño de la investigación	43
1. Tipo de estudio	43
2. Variables	43
3. Ensayos	44
G. Diseño estadístico	44
1. Análisis de resultados	44
IX. Resultados	47

A. Preparación de la solución de ion clorito activado (MSM)	47
B. Actividad citotóxica sobre <i>Artemia salina</i>	47
C. Actividad antimicrobiana: bacterias	48
D. Actividad antimicrobiana: levaduras	49
E. Viabilidad celular y ensayo linfoproliferativo	49
F. Ensayo hemolítico para evaluar la actividad del complemento	50
X. Discusión de resultados	51
XI. Conclusiones	55
XII. Recomendaciones	56
XIII. Referencias bibliográficas	57
XIV. Anexos	63
A. Anexo 1: Gráficos del ensayo de actividad citotóxica	63
B. Anexo 2: Gráficos de los ensayos de actividad antimicrobiana	67
C. Anexo 3: Gráficos del ensayo de viabilidad celular en linfocitos	71
D. Anexo 4: Gráficos del ensayo de hemólisis en eritrocitos	75

II. RESUMEN

Citotoxicidad es la propiedad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos a nivel celular que pueden incluir lesiones reversibles hasta la muerte por apoptosis o necrosis. Paralelamente, la inmunomodulación es la propiedad de una sustancia de intervenir en los procesos metabólicos de regulación, modificando ya sea por estimulación o inhibición, el curso de la respuesta inmune. A nivel fisiológico, algunas sustancias por acción biocida, inducen la liberación de endotoxinas microbianas, desencadenando la estimulación de la respuesta inmune de forma sostenida. Esta propiedad fue atribuida por Jim Humble a la solución de clorito de sodio (NaClO_2) activado en medio ácido que induce a la formación de ion clorito (ClO_2^-), popularmente conocida como “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) del cual se han descrito efectos terapéuticos en procesos patológicos crónicos de tipo metabólico, neoplásico y/o infeccioso (Sachana, & Hargreaves, 2007; Ooi, & Liu, 2000; Humble, 2006).

La finalidad de este estudio fue establecer el efecto citotóxico e inmunomodulador *in vitro* de la solución de ion ClO_2^- activado, contra nauplios de *Artemia salina*, linfocitos y eritrocitos humanos, bacterias y levaduras. La actividad inmunomoduladora sería evaluada sobre la actividad linfoproliferativa de linfocitos T y la capacidad hemolítica de proteínas del sistema de complemento.

La solución de MSM se preparó a partir de una concentración de 90% p/p de NaClO_2 , la cual mostró ser hipertónica y fuertemente oxidativa (pH 2.6). Se determinó una CIM de 6.25 mg/mL y a partir de una regresión logarítmica, que la concentración de 4.48 mg/mL ($\text{IC}_{95\%}$ 4.44 – 4.53 mg/mL) ocasionó que 50% de la población de células evaluadas murieran (DL_{50}). La concentración propuesta en el protocolo de Humble (400 mg/mL) fue 89 veces mayor que la DL_{50} encontrada. El valor de $p = 0.013$ evidenció actividad citotóxica significativa. No se evidenció actividad antimicrobiana (bacterias y levaduras) y actividad inmunomoduladora significativas ($p > 0.05$) (Humble, 2006; Merck Group, 2000).

La solución de MSM demostró ser altamente tóxica, sin evidencia de actividad antimicrobiana y efectos inmunomoduladores *in vitro*. Los resultados obtenidos y presentados en este estudio no pretenden más que establecer el comportamiento de la solución como un antecedente para la validación de su uso seguro con conocimiento de sus potenciales riesgos.

III. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune basa su función en mecanismos celulares y humorales para discriminar entre lo propio y lo extraño, diferenciándose por la especificidad de los procesos y el desarrollo de memoria. La inmunomodulación ha sido descrita como el cambio en el sistema inmunitario causado por sustancias que activan o debilitan su función, indistintamente clasificadas como orgánicas o inorgánicas.

En el año de 1997, Jim Humble reportó y patentó el uso de clorito de sodio (NaClO_2) activado en medio ácido para el tratamiento de malaria en jornaleros de la jungla de Guayana. Este producto lo denominó “Oxígeno Estabilizado” y popularmente se distribuye en México como el “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM).

El MSM ha sido propuesto como tratamiento alternativo para el manejo de enfermedades crónicas de tipo metabólico, neoplásico y/o infeccioso. Con base en los principios homeopáticos de dosis mínima e individualidad medicamentosa, se describió el mecanismo de acción por activación del ion clorito que por capacidad biocida, induce la liberación de endotoxinas microbianas, desencadenando la estimulación de la respuesta inmune de forma sostenida. En los últimos años ha tenido auge popular como suplemento alternativo pero no cuenta con respaldo científico basado en evidencia derivado de investigación clínica que asegure su efectividad, libre o con el mínimo de efectos adversos que afecten la integridad de los usuarios que lo consumen; por ende, carece del registro avalado por entidades regulatorias.

El presente estudio se realizó para establecer el efecto citotóxico e inmunomodulador *in vitro* de la solución de ion clorito activado de acuerdo con el protocolo de preparación propuesto por Humble. El efecto citotóxico de la solución se determinó midiendo la viabilidad de nauplios de *Artemia salina*, linfocitos, eritrocitos humanos, bacterias y levaduras; la actividad inmunomoduladora se estableció a partir de la actividad linfoproliferativa de linfocitos T y la capacidad hemolítica de proteínas del sistema de complemento.

Los hallazgos de toxicidad y ausencia de actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de este estudio deben interpretarse en el contexto de las metodologías empleadas. No se pretendió más que establecer el comportamiento *in vitro* como un antecedente para la validación de su uso seguro con conocimiento de sus riesgos tóxicos potenciales.

IV. ANTECEDENTES

A. TOXICIDAD CELULAR

1. Mecanismos de toxicidad celular por fármacos

Toxicidad es la propiedad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos detrimentales. La toxicidad indica la potencia de una sustancia venenosa y no la afección producida por ésta (concepto que corresponde a intoxicación o envenenamiento). La toxicidad se expresa como la cantidad de la sustancia en mg/Kg de peso vivo que origina efectos biológicos determinados, en un tiempo dado y en una especie establecida. Existen diversos indicadores de toxicidad, siendo uno de los más usados la dosis letal 50 (DL₅₀); éste es un indicador estadístico de toxicidad aguda, el cual señala la cantidad del tóxico que causa la muerte del 50% de los animales intoxicados en ensayos de investigación (Sachana, & Hargreaves, 2007).

La toxicidad depende de varios factores como el tiempo de exposición a la sustancia en cuestión, el número de exposiciones y la vía de administración. Se define como toxicidad aguda cuando una única exposición puede causar un daño severo, mientras que la toxicidad crónica es aquella que involucra exposiciones prolongadas en tiempo y/o dosis para desencadenar inestabilidad metabólica y daño severo (Dalmazzo, 2009).

La farmacocinética describe el marco temporal de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación o excreción de las sustancias químicas. Estas variables farmacocinéticas pueden tener mucha importancia en relación con los mecanismos de toxicidad, y en algunos casos pueden determinar si se produce o no. La velocidad con que una sustancia química se elimina del cuerpo y se detoxifica es lo que suele expresarse como su vida media, que es el tiempo que se necesita para que el 50% de ella sea excretado o convertido en una forma no tóxica. No obstante, si una sustancia química se acumula en una determinada célula u órgano es motivo para sospechar y analizar detenidamente su potencial toxicidad (Osés, Burillo, & Munné, 2003).

La toxicidad puede describirse a diferentes niveles biológicos. La lesión puede evaluarse en la totalidad del organismo, en los sistemas orgánicos, en las células o en las

moléculas. Los sistemas orgánicos que pueden ser afectados incluyen al sistema nervioso, cardiovascular, respiratorio, renal, gastrointestinal, muscular, sanguíneo, endocrino e inmunitario. Son órganos decisivos el hígado, el riñón, el pulmón, el cerebro, el corazón, la piel, los ojos y las gónadas (Oses, et al., 2003).

Entre los efectos adversos a nivel celular/bioquímico figuran la interferencia de la función proteínica normal y de la función de los receptores endocrinos, la inhibición del metabolismo energético y la inhibición o inducción de enzimas. Entre los efectos adversos a nivel molecular figuran las alteraciones de la función normal de la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN), la unión de receptores específicos (citoplasmáticos o nucleares) de genes o productos génicos. El deterioro funcional de un sistema orgánico importante suele deberse a alteraciones moleculares en determinadas células diana de ese órgano (Cohen, 2010; Oses, et al., 2003).

2. Lesión y muerte celular

a. Definición

La lesión celular se define como un hecho o estímulo, por ejemplo una sustancia química tóxica, que perturba la homeostasis normal de la célula que hace que se produzcan diversos acontecimientos de desequilibrio metabólico. Las dianas principales de la lesión son la inhibición de la síntesis del adenosín trifosfato (ATP), la interrupción de la continuidad de la membrana plasmática y la supresión de factores esenciales para el crecimiento. Las lesiones letales acaban en la muerte de la célula al cabo de un período de tiempo variable, que depende de la temperatura, el tipo de célula y el estímulo; pero también pueden producirse lesiones subletales o crónicas que provocan un estado de alteración de la homeostasis que, aunque anómalo, no desemboca en la muerte de la célula (Suhre, Shin, Petersen, Mohny, Meredith, & Wagele, et al., 2011).

b. Mecanismos para la lesión celular

Son muchas las clases de sustancias tóxicas que pueden inducir una lesión celular aguda y después la muerte. Análogos químicos como el cianuro de potasio que inhibe la glicólisis; los carcinógenos químicos que se unen con enlaces covalentes a proteínas de los ácidos nucleicos; sustancias oxidantes que provocan la formación de radicales

libres y lesión oxidativa; la activación del complemento y diversos ionóforos de calcio tienen como resultado final anoxia e isquemia. La muerte celular es un importante componente de la carcinogénesis; muchos carcinógenos químicos producen necrosis aguda e inflamación, seguidas de regeneración y preneoplasia (Suhre, et al., 2011; Jaeschke, Gores, Cederbaum, Hinson, & Lemasters, 2002).

El otro tipo frecuente de lesión inicial que deriva en muerte celular aguda es la modificación de la función de la membrana plasmática que puede consistir en un daño directo con permeabilización, como en los casos de trauma o de activación del complejo C_{5b}-C₉ del complemento; por daño mecánico a la membrana celular o en la inhibición de la bomba de sodio y potasio por intoxicación por glicósidos (Munné, Saenz, Izura, Burillo, & Nogué, 2003).

c. Rutas de señalización y tipos de lesión celular

En los casos de lesión letal se observa antes de la muerte celular la fase pre-letal. Si durante ese tiempo se elimina el estímulo causante, la célula se recupera. Sin embargo, llega un momento denominado el punto sin retorno o punto de muerte celular en el que a pesar de eliminarse la causa de la lesión la célula no puede recuperarse, sino que pasa por un proceso de degradación e hidrólisis hasta llegar finalmente al equilibrio fisicoquímico con el entorno. Es la fase que se conoce como necrosis. Durante la fase preletal se producen principalmente dos tipos de alteraciones dependiendo de la célula y del tipo de lesión denominadas apoptosis y oncosis (Spencer, & Sorger, 2011).

i. Apoptosis y oncosis

Se reconoce a la apoptosis como un proceso de muerte celular programada. Cuando se produce en células aisladas con la fagocitosis subsiguiente, la apoptosis no suele provocar inflamación. Antes de morir, las células apoptóticas muestran un citosol muy denso con las mitocondrias normales o condensadas. El retículo endoplásmico es normal o está sólo ligeramente dilatado. La cromatina del núcleo está claramente acumulada a lo largo de la envoltura y alrededor del nucléolo. El contorno del núcleo es también irregular y hay fragmentación nuclear. La condensación de la cromatina está asociada con una fragmentación del ADN que, en

muchos casos, se produce entre nucleosomas. En este proceso el aumento de calcio iónico puede estimular el flujo de salida de potasio, que hace que la célula se retraiga, probablemente con necesidad de ATP. El incremento sostenido del calcio iónico tiene diversos efectos deletéreos como la activación de proteasas, endonucleasas y fosfolipasas. La activación de las endonucleasas provoca roturas sencillas y dobles del ADN; la activación de las proteasas modifica una serie de sustratos como la actina y proteínas conexas, que lleva a la formación de vesículas. También se ve incrementada la activación de quinasas que participan en la activación de factores de transcripción y activación de fosfolipasas que tiene como resultado la permeabilización de la membrana plasmática y de las membranas intracelulares como las membranas interiores de las mitocondrias (Spencer, & Sorger, 2011; Ramos, Asgari, Liu, Yvon, Heslop, & Rooney, et al., 2010).

La oncosis se caracteriza por un incremento en el tamaño celular inmediatamente después de la lesión celular. Esto se debe al incremento de los cationes en el agua intracelular secundaria a la ausencia de ATP y desequilibrio en el metabolismo del sodio. Histológicamente se observa incremento de volumen en el citosol, retículo endoplásmico y el aparato de Golgi con la consecuente formación de vesículas acuosas entorno a la superficie de la célula. Las mitocondrias se condensan al principio, pero incrementan su volumen al verse dañada la membrana mitocondrial interior. En este tipo de alteración preletal, la cromatina se condensa y en última instancia se degrada (Spencer, & Sorger, 2011).

ii. Necrosis

Con el término necrosis se designa una serie de alteraciones que se producen después de la muerte celular, cuando la célula se convierte en detritos que son típicamente eliminados por la respuesta inflamatoria. Cabe distinguir dos tipos: la necrosis oncótica y la necrosis apoptótica. La necrosis oncótica suele darse en zonas amplias por ejemplo, en un infarto de miocardio o regionalmente en un órgano que ha sufrido toxicidad química. Se ven afectadas amplias zonas del órgano y las células necróticas incitan rápidamente a una reacción inflamatoria al principio aguda y posteriormente crónica. Si el

organismo sobrevive, en muchos órganos siguen a la necrosis la eliminación de las células muertas y la regeneración por ejemplo, en el hígado o riñón después de una toxicidad química (Nanji, & Hiller-Sturmhöfel, 1997).

La necrosis apoptótica se desarrolla típicamente a nivel de células individuales. Los detritos necróticos se forman en el interior de los fagocitos o macrófagos o de las células parenquimales vecinas. Entre las primeras manifestaciones de la necrosis celular están las interrupciones de la continuidad de la membrana plasmática y la aparición de densidades floculentas, que son proteínas desnaturalizadas dentro de la matriz mitocondrial. En algunas formas de lesión que inicialmente no interfieren la acumulación de calcio en las mitocondrias, se observan en el interior de éstas depósitos de fosfato de calcio. También se fragmentan de manera análoga otros sistemas membranosos, como el retículo endoplásmico, los lisosomas y el aparato de Golgi. Al final, la cromatina del núcleo sufre una lisis resultado del ataque de hidrolasas lisosómicas. Tras la muerte celular, las hidrolasas lisosómicas desempeñan un papel importante en la eliminación de los detritos con la activación de catepsinas, nucleolasas y lipasas, pues éstas pueden sobrevivir al pH ácido de las células necróticas mientras que otras enzimas celulares se han desnaturalizado y desactivado (Ramírez, Carracedo, Moreno, & Guerra, 1999).

B. INMUNOTOXICOLOGÍA E INMUNOMODULACIÓN

1. Sistema inmunológico

Conjunto de órganos, células y moléculas encargados de la defensa del organismo frente a infecciones, intoxicación por partículas orgánicas e inorgánicas y la actividad neoplásica. La respuesta inmune basa su función en la discriminación de lo propio y lo extraño, diferenciándose por la especificidad de procesos y desarrollo de memoria inmunológica (Chaplin, 2010).

La respuesta inmunitaria está estructurada por una secuencia compleja de eventos; se inicia con la presencia de un estímulo inmunogénico y por lo general, culmina con la eliminación del agente que lo provoca. Esta respuesta depende principalmente de dos

tipos celulares: inespecíficas (neutrófilos, eosinófilos, células cebadas y células citotóxicas) y específicas (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células presentadoras de antígeno). Simultáneamente, éstas interactúan de manera integral con factores humorales como anticuerpos, el sistema de complemento, citocinas, cininas, sistemas de coagulación y fibrinolíticos entre otras proteínas que dan lugar a los procesos de inflamación, neutralización, opsonización, lisis, etc. Estos mecanismos se agrupan en dos niveles: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida (Trowsdale, & Parham, 2004; James, 2006; Chaplin, 2010).

2. Respuesta inmune innata

También denominada inmunidad natural. Se refiere a todas las medidas congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un organismo o partícula extraña; su acción no es dependiente de una exposición previa ni tampoco se modifica con exposiciones repetidas, es decir, es carente de memoria. En la respuesta innata intervienen barreras físicas (piel, anexos y mucosas), químicas y biológicas como células inespecíficas y factores solubles como el sistema del complemento, proteínas de fase aguda y mediadores inflamatorios (Bonilla, & Oettgen, 2010).

3. Respuesta inmune adquirida

También denominada inmunidad adaptativa. Se refiere a la respuesta que en el primer contacto con un organismo o partícula extraña es débil o ausente, pero que se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes y es capaz de establecerse con igual intensidad, es decir, genera memoria. En la respuesta adquirida la actividad celular predominante es dada por células específicas mientras que la actividad humoral radica en la producción de citocinas y anticuerpos (James, 2006; Chaplin, 2010).

4. Inflamación

Respuesta fisiológica del organismo ante la lesión tisular que activa procesos inmunológicos de defensa y reparación con función de diferentes mecanismos humorales y celulares. Se describe inflamación como mecanismo inmunológico, presente en

procesos infecciosos y oncológicos e inflamación inespecífica a la derivada de traumas, quemaduras y procesos de obstrucción vascular (Trowsdale, & Parham, 2004).

Histológicamente se caracteriza por rubor, calor, tumefacción y dolor. Se observan cambios de diámetro y permeabilidad de los vasos sanguíneos locales y en las moléculas de superficie expresadas en sus células endoteliales limitantes; activación de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (con la cronicidad de células mononucleares), del sistema de coagulación y otros factores humorales denominados mediadores inflamatorios, que consisten en proteínas, péptidos y compuestos orgánicos pequeños no relacionados con capacidad de difusión que se constituyen en moléculas de señalización, que pueden producir efectos de manera directa o también inducir la producción de otros mediadores para dar lugar a una respuesta más especializada. Estos mediadores provienen de tres fuentes principales: los secretados por células que sufren trauma o estrés; los que son productos intermedios de dicho trauma tisular y los que provienen de macromoléculas microbianas únicas (Eltzschig, & Carmeliet, 2011).

5. Mecanismos humorales y componentes celulares de la respuesta inmune innata

Los principales agentes activos de la respuesta inmune humoral son constituidos por enzimas, proteínas plasmáticas y líquidos tisulares. Se caracterizan por expresarse fisiológicamente sin importar que sus efectos protectores se requieran o no, sin perder o modificar sus propiedades intrínsecas; su principal función es que son capaces de reconocer blancos o sustratos identificables dentro de una amplia gama de microorganismos pero que no se observan en el cuerpo humano en condiciones normales, siendo denominadas como patrones moleculares específicos de patógenos. A través del reconocimiento de estos patrones comunes, las proteínas del hospedero son capaces de suministrar una protección relativamente inespecífica. Entre los efectores humorales mejor conocidos se mencionan: lisozima, sistema de complemento, proteínas de fase aguda y proteínas de unión a lipopolisacáridos (Bonilla, & Oettgen, 2010).

El sistema del complemento se define como un grupo de moléculas proteicas derivadas del hígado y macrófagos, que normalmente circulan en forma de proenzimas con actividad latente de proteasas. El mecanismo en forma de cascada se activa y

autoamplifica cuando una de las proteasas se corta proteolíticamente para después catalizar la lisis y activación de otra proteasa diferente. Entre los efectos protectores del complemento se observan: perforación de la superficie microbiana, opsonización y como factor quimioatrayente que favorece la fagocitosis. Se activa a través de tres rutas distintas; todas ellas implican la activación de la proteína llamada C_3 : la vía clásica, la vía alterna y la vía de las lectinas (Walport, 2002; Carroll, 2004).

Las proteínas de la vía clásica se denominan C_1 - C_9 en el orden secuencial C_1 , 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9. El complejo macromolecular C_1 está conformado por tres proteínas (C_{1q} , C_{1r} y C_{1s}) y el resto los componentes del complemento, por la acción de proteinasas, divide cada uno en dos partes (a y b) generando productos de fusión y de fisión. Esta vía se inicia cuando el inmunocomplejo formado por IgG o IgM se une a C_{1q} y lo activa en presencia del ion calcio (Carroll, 2004; Fujita, Endo, & Nonaka, 2004).

Los componentes de la vía alterna inducen varios mecanismos inmunes, tales como fagocitosis e inflamación, a través de la activación de C_3 . En presencia de magnesio, C_3 puede interactuar con otra proteína circulante, el factor B de la vía alterna (análogo a C_2), y en presencia del factor D continúa la activación de la vía alterna. La properdina, proteína plasmática, se une a la convertasa de la vía alterna y la estabiliza, disminuyendo su velocidad de decaimiento y permitiendo continuar con la cascada del complemento. Esta vía es activada por la presencia de polisacáridos (Strainic, Liu, Huang, An, Lalli, & Muqim, et al., 2008).

La vía de las lectinas es una especie de variante de la ruta clásica, que se activa sin la necesidad de la presencia de anticuerpos. La activación se lleva a cabo por medio de una proteína de unión a manosa (PUM o MBP por sus siglas en inglés manose binding protein). Se trata de un componente parecido estructuralmente a C_{1q} : hexámero con 18 cadenas polipeptídicas idénticas enrolladas de tres en tres. Los hexámeros de PUM se pueden unir con dos unidades de C_{1r} y dos de C_{1s} , pero parece que va acompañada de su propia serín-proteasa (denominada MASP), que muestra casi 40% de homología con C_{1r} o C_{1s} . Se une preferentemente a los extremos de manosa, fucosa y glucosamina de polisacáridos o glucoproteínas de membrana de gran variedad de bacterias. De modo similar a lo que ocurre con el complejo C_1 , al unirse con esos carbohidratos, sufre un

cambio conformacional que a su vez activa a su proteína asociada a la PUM (MASP-1, MASP-2 y MASP-19). Una vez activada actúa secuencialmente sobre C₄ y C₂, para producir una C₃-convertasa de la ruta clásica (Carroll, 2004; Fujita, et al., 2004; Strainic, et al., 2008).

Por otro lado, el término de células inflamatorias se utiliza para designar a las células que participan en las reacciones inflamatorias. Por su localización se clasifican en células residentes de tejido (macrófagos y mastocitos) y las células circulantes que penetran a los tejidos únicamente en el transcurso de una respuesta inflamatoria (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas y linfocitos). Las propiedades de defensa son reguladas debido a la expresión de receptores superficiales para componentes de fisión del complemento, para la fracción Fc de anticuerpos y para varias citocinas (García, 2008).

6. Mecanismos humorales y componentes celulares de la respuesta inmune adquirida

Los componentes humorales de la respuesta inmune adquirida incluyen a las inmunoglobulinas y citocinas (interleucinas y quimiocinas). Las inmunoglobulinas (anticuerpos) son glicoproteínas del tipo gamma globulina. Las funciones efectoras mediadas incluyen la neutralización de microorganismos o de productos tóxicos secretados por ellos, la activación del sistema del complemento, la opsonización de patógenos para facilitar la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y la hipersensibilidad tipo I en la cual los anticuerpos inducen la activación y degranulación de los mastocitos. Los isotipos de las inmunoglobulinas se denominan IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM cada una con funciones y características determinantes (Ahmed, Saha, Patwardhan, Shivprasad, & Nandi, 2009).

Se denominan interleucinas (IL) a proteínas solubles de bajo peso molecular que actúan como mensajeros químicos a corta distancia mediando procesos de proliferación, crecimiento celular, inflamación, diferenciación y reparación. Son sintetizadas principalmente por linfocitos y macrófagos, aunque también pueden intervenir células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea. Inician la respuesta inflamatoria, y definen la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica. Entre las

principales se mencionan: Factor de necrosis tumoral (FNT) α , FNT- β , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17 (Feghali, & Wright, 1997).

Las quimiocinas son un grupo de moléculas especializadas, que además de la quimiotaxis, cumplen funciones importantes en la proliferación o apoptosis de diferentes células, la morfogénesis tisular, hematopoyesis, angiogénesis y en el desarrollo de la respuesta inmune específica (inducción del tráfico de células dendríticas y de linfocitos T colaboradores [T_h] de tipo 1, tipo 2 y linfocitos B en el tejido linfoide secundario). Las células blanco de las quimiocinas son neutrófilos, fibroblastos, basófilos, eosinófilos, condrocitos, linfocitos T y B, células del músculo liso, endotelio, células asesinas naturales (NK, natural killer por sus siglas en inglés), monocitos, queratinocitos y megacariocitos. Tienen un peso molecular aproximado de 8 a 15 kDa, y se dividen en cuatro subfamilias: CXC, CC, C y CX3C (Moser, & Willimann, 2004).

Con respecto a los componentes celulares, los linfocitos se constituyen en las células predominantes en una respuesta inmune específica. De acuerdo a la expresión de marcadores de superficie celular, se han identificado tres líneas de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B y células NK (Buckner, 2010).

Los linfocitos T son células que nacen de la maduración de células germinales del timo e inician la respuesta inmunitaria, median las respuestas efectoras antígeno-anticuerpo y regulan la actividad de otros leucocitos. De acuerdo a la expresión de los antígenos de membrana, los linfocitos T maduros se dividen en:

- Células T citotóxicas (T_c): Tienen el marcador $CD4^-8^+$ en su membrana, median la mayoría de la citotoxicidad específica para el antígeno. Reconocen a los antígenos por medio de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I, liberan IL-2 e interferón gamma ($INF-\gamma$) (Nelson, 2004).
- Células T colaboradoras/inductoras (T_h): Tienen el marcador $CD4^+8^-$. Tienen la capacidad de incrementar respuestas de células B y amplificar las respuestas de las células T_c . Reconocen a los antígenos por medio del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) al CMH clase II. También secretan factores solubles que influyen las funciones efectoras mediadas por otros leucocitos (Buckner, 2010).

Los linfocitos B expresan inmunoglobulinas (Ig) en la membrana. La Ig es la responsable de captar el antígeno y el consecuente reconocimiento, activa estas células e inicia la respuesta inmune humoral con una constante secreción policlonal cuando el antígeno posee varios epitopos, que inician mecanismos efectores que generalmente culminan con la eliminación de dicho antígeno (Sell, & Max, 2001).

Las células NK constituyen la tercera estirpe de células de tipo linfoide cuyos gránulos citoplasmáticos contienen perforinas que ejecutan el mecanismo lítico sobre la célula blanco. Carecen de receptor TCR y CD3, característicos de los linfocitos Tc y de IgM. Expresan en su superficie las moléculas Fc γ R-III (CD16) y CD56. Su función más importante es defender al organismo contra infecciones virales y tumores. Su citotoxicidad no es restringida por CMH y no poseen especificidad por antígeno ni adquieren memoria inmunológica (Nelson, 2004).

7. Mecanismos de regulación de la respuesta inmune

La respuesta inmune, al igual que todos los sistemas biológicos, está sujeta a diversos mecanismos de control que sirven para mantener al sistema inmunitario en un estado de reposo cuando la respuesta a un determinado antígeno ha dejado de ser necesaria. La naturaleza de la respuesta, tanto cuantitativa como cualitativamente, está determinada por muchos factores, entre ellos la forma y vía de administración del antígeno, antecedentes de exposición y el trasfondo genético del individuo, entre otros (Jiang, & Chess, 2006; Seltman, 2011).

Los mecanismos de regulación descritos incluyen procesos ligados a antígenos, anticuerpos, actividad de linfocitos T e IL, redes idiotipo anti-idiotipo y regulación neuroendocrina (Jiang, & Chess, 2006).

8. Inmunotoxicología

La inmunotoxicología es la rama que estudia los hechos que desembocan en efectos no deseados como resultado de la interacción de xenobióticos y/o moléculas químicas utilizadas como terapia farmacológica no convencional con el sistema inmunitario. Estos hechos no deseados pueden deberse a un efecto directo y/o indirecto sobre componentes

del sistema inmunitario o a una respuesta inmunológica del hospedero al compuesto y/o sus metabolitos o a sus propios antígenos modificados (Ladics, & Woolhiser, 2007).

Cuando el sistema inmunitario actúa como diana pasiva de las agresiones químicas, el resultado puede ser una reducción de la resistencia a las infecciones y a determinadas formas de neoplasia, o una desregulación/estimulación inmunitaria que desencadenan alergias o autoinmunidad. La autoinmunidad se desencadena cuando el sistema inmunitario responde a la especificidad antigénica del xenobiótico o del antígeno del hospedero modificado evidenciado así el efecto tóxico (Ladics, & Woolhiser, 2007; Bussiere, 2010).

Se han desarrollado modelos animales para investigar la inmunosupresión inducida por sustancias químicas. Para la realización de ensayos se adopta un enfoque en tres niveles: el objetivo del primer nivel es identificar los inmunotóxicos potenciales; el segundo nivel consiste en la caracterización y confirmación de la inmunotoxicidad observada, dejando para el tercer nivel todos los estudios especiales sobre los mecanismos de acción del compuesto. Dadas las diferencias filogenéticas existentes, prácticamente no hay modelos animales adecuados para investigar la capacidad de las sustancias químicas de inducir enfermedades autoinmunes por efectos inmunotóxicos (Bussiere, 2010).

9. Inmunomodulación

La inmunomodulación es un abordaje terapéutico en el que se interviene en los procesos de autorregulación, modificando el curso espontáneo de la respuesta inmune. Las sustancias inmunomoduladoras son fármacos que tienen la capacidad de mejorar o disminuir las funciones del sistema inmunitario sin ser inmunotóxicas; pueden ser inmunoestimulantes o inmunosupresores. Dichas sustancias competen al estudio de inmunofarmacología, la cual investiga alternativas químicas y naturales que representen una posibilidad terapéutica útil, siendo su principal campo de aplicación las enfermedades con un componente inmunológico establecido (Ooi, & Liu, 2000).

Los fármacos inmunoestimuladores se utilizan para favorecer la respuesta en enfermedades infecciosas, neoplasias, inmunodeficiencias primarias y secundarias, fallo en la transferencia pasiva de anticuerpos, entre otros casos. La inmunoestimulación se

requiere cuando a pesar de funcionar con normalidad, la actividad natural del sistema inmunitario no es suficiente para reducir la carga infectiva como en el caso de infecciones recurrentes o cuando se considera como medida terapéutica coadyuvante para restituir el potencial del sistema inmunitario. Estos fármacos tienen como diana inmunológica la estimulación de células que liberan citocinas, las cuales actuarán modificando el estado basal potencializando la respuesta especializada a través de los linfocitos. Ha sido descrita la inmunoestimulación por agentes endógenos como citocinas, interferones y otras moléculas recombinantes y agentes exógenos como fracciones microbianas (ADN, lipoproteínas, etc.) (Gan, Zhang, Yang, & Xu, 2004; Ooi, & Liu, 2000).

Los fármacos inmunosupresores están indicados para mitigar la respuesta inmunitaria tras el fallo en los mecanismos de tolerancia a los antígenos propios como en el caso de las enfermedades autoinmunes o para evitar el rechazo de órganos trasplantados. Ha sido descrita la inmunosupresión por agentes físicos (radiación ionizante y no ionizante), por anticuerpos y por agentes químicos (Muñoz, 2005).

C. ION CLORITO ACTIVADO

1. Definición química

Químicamente definido como un oxoanión de fórmula ClO_2^- . En un medio acuoso es producto de la hidrólisis del ácido cloroso, en donde el cloro está en estado de oxidación +3. El ácido cloroso (HClO_2) sólo es estable a bajas concentraciones. Dado que no se puede concentrar, no es un producto comercial. Sin embargo, el clorito de sodio (NaClO_2) es estable y relativamente económico como para estar comercialmente disponible. La forma gaseosa de ClO_2 es producida por la reducción de clorato sódico (NaClO_3) en una solución de ácido fuerte con un agente reductor adecuado. El ClO_2^- es absorbido en una solución alcalina y se reduce con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con la subsecuente obtención de NaClO_2 (Deininger, Ancheta, & Ziegler, 1998).

El dióxido de cloro (ClO_2) disuelto en agua con alto contenido de materia orgánica no forma trihalometanos, subproductos con efecto carcinogénico, que se obtienen con el uso de hipoclorito de sodio al 5%. No obstante, en medios ácidos pierde su estabilidad molecular produciendo ión clorito (ClO_2^-) y ion clorato (ClO_3^-) cuya interacción con la

molécula intacta de ClO_2 resultan tóxicos en concentraciones mayores a 1 mg/L. El efecto directo de estos subproductos sobre el organismo no está del todo definido y su uso a nivel industrial no está legislado uniformemente a nivel internacional; se ha recomendado que agua tratada con ClO_2 para consumo humano requiere un post-tratamiento para la eliminación de estos iones. La presencia de ion clorito en altas concentraciones (3-5 mg/L) es caracterizado por olor fétidos similares a la orina de gato, keroseno o cloro (Dietrich, Orr, Gallagher, & Hoehn, 1992).

2. Usos y aplicaciones actuales

Se reconoce al ClO_2 como biocida oxidante y no una toxina metálica. Esto significa que mata microorganismos por la interrupción del transporte de nutrientes a través de la membrana celular, no por interrupción del proceso metabólico (Deininger, et al., 1998).

La principal aplicación de NaClO_2 es la generación de ClO_2^- para el blanqueo y el desmantelamiento de los textiles, pulpa y papel. También se utiliza en procesos de tratamiento de agua, en agricultura (preparación de almidón de maíz, deshidratación de uva), mantenimiento y esterilización de carnes rojas y blancas, control microbiológico de organismos altamente infecciones y/o de difícil erradicación por la formación de capas de biofilm y control de compuestos químicos como gas sulfuro, mercaptenos, aminas y compuestos nitrogenados (Junli, Li, Nenqi, Fang, & Li, 1997).

Su eficacia es comparable, aunque en concentraciones más bajas, a otros productos derivados de cloro y/o al ozono. Entre sus ventajas se enlistan: a) La capacidad bactericida es relativamente inafectada con valores de pH 4-10; b) Mejor solubilidad y menor tiempo de contacto; c) Bajos índices de corrosión u desgaste sobre las superficies empleadas y d) No reacciona ni causa metabolitos tóxicos con productos a base de amonio y sus derivados ni con triahalometanos (subproductos del proceso de tratamiento de agua) y no produce mutágenos (Dietrich, et al., 1992; Aieta, & Berg, 1986).

En la Unión Europea, a partir de 2009, el uso de NaClO_2 ha sido eliminado como biocida en espacios privados del área de salud pública, para la higiene veterinaria, de hortalizas y agua potable por reporte de casos de inflamación severa en mucosas (Satar, Kayraldiz, Rencuzogullari, Karakoc, Sebe, & Avci, et al., 2009).

3. Toxicidad

La base de datos de productos químicos de Merck, versión 2000, describe al NaClO_2 como una sustancia nociva, irritante, corrosiva no combustible, con una DL_{50} oral en rata de 1,136 mg/Kg (solución al 25%). En contacto con ácidos, libera gases de alta toxicidad con potencial explosivo. Se debe evitar el contacto con ácidos, sustancias inflamables, cianuros, azufre, amonio, metales pulverizados, compuestos fosforados, cloro y agentes reductores (Merck Group, 2000).

Por ingestión de solución puede desencadenarse náusea, vómito, sangrado e irritación de las mucosas, especialmente de boca, esófago e intestino. Tras inhalación de vapores y/o aerosoles se presenta irritación de mucosas, tos, edema pulmonar y espasmo bronquial; la exposición crónica a gases predispone al desarrollo de bronquitis. El contacto ocular puede desarrollar lesiones graves. Por la inestabilidad en medio ácido, los subproductos que se generan (cloruros y cloratos) pueden inducir shock hepático e insuficiencia renal. No se ha definido con claridad el efecto teratógeno tras la exposición crónica a esta sustancia (Dietrich, et al., 1992; Merck Group, 2000).

4. Ion clorito activado: “Milagroso Suplemento Mineral”

En 1997, Jim Humble durante una expedición en las Guyanas Francesas utilizó ClO_2 en jugo de limón, al que nombró “oxígeno estabilizado”, para tratar a sus compañeros de viaje que sufrían de malaria reportando en ellos una evolución positiva. A su retorno en Estados Unidos, se dedicó a identificar el mecanismo de acción que se centra en la actividad del ion clorito activado (Humble, 2006).

Tras un seguimiento en África de pacientes con malaria, expuso que el “Oxígeno Estabilizado” induce una reacción similar a la reacción de Herxheimer que ocurre cuando grandes cantidades de toxinas son liberadas en el cuerpo tras la muerte de bacterias por terapia antibiótica o una rápida desintoxicación en donde el metabolismo no es lo suficientemente rápido para la efectiva eliminación a través de hígado y riñones. Esto ocasiona un incremento en citocinas inflamatorias que se manifiesta en fiebre, escalofríos, cefaleas, mialgia, náuseas y exacerbación de lesiones primarias en piel como reflejo de la

intensidad de la respuesta inflamatoria. En este caso, el ion clorito activado funciona como agente biocida desencadenante (Humble, 2006; Romero, 2005).

Basándose en este principio, propone que todo proceso infeccioso y de desequilibrio metabólico, que incluye componentes inmunológicos, a nivel celular pueden ser superados tras la reactivación de la respuesta inmune por la acción del ion clorito activado, al que denominó “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) (Humble, 2006).

Posteriormente Humble publicó el libro titulado “La solución mineral maestra del tercer milenio” en donde se recopila la historia, desarrollo y alcances tras el uso de la solución. No existe un protocolo estandarizado para la posología, encontrándose discrepancias en la forma de utilización para mantenimiento de un estado general óptimo de salud, para el tratamiento de enfermedades metabólicas, neoplasias, procesos infecciosos bacterianos y virales, parasitemias y parasitosis, artritis y alergias, quemaduras, intoxicación alimentaria y mordeduras de serpiente. Se ha descrito también un protocolo para uso veterinario. Sin embargo, no cuenta con el aval de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Henao, Sierra, & Gaitán, 2003; Ogata, & Shibata, 2008).

En México se encuentra disponible la solución acuosa de NaClO_2 al 28% que se ajusta a las indicaciones hechas por Humble para su preparación. Se recomienda utilizar seis gotas de la solución en 15 mL de vinagre (5% de ácido acético), limón o ácido cítrico, tras una espera de alrededor de tres a cinco minutos, periodo en el que ocurre una reacción exotérmica pocas veces perceptible, se debe beber en medio vaso de agua evitando sorbos. Esta dosis debe mantenerse dos veces por semana para menores de 40 años y diario para quienes superan esta edad (Humble, 2006).

Para el manejo de enfermedades metabólicas y procesos infecciosos se propone un inicio de seis gotas e incrementar paulatinamente la dosis hasta 15 gotas, dos veces al día. Una vez resuelto el cuadro se recomienda continuar su uso con dosis inicial de mantenimiento. El apareamiento de náuseas se justifica como normal por reflejo de la acción de la sustancia (Humble, 2006).

V. JUSTIFICACIÓN

El “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) ha sido propuesto y utilizado como suplemento alternativo para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. Su acción ha sido descrita como dependiente de su capacidad biocida y oxidante que estimula la respuesta inmune luego de la liberación de endotoxinas microbianas. El principio activo del producto es NaClO_2 , compuesto altamente tóxico, potencialmente explosivo e inestable en medio acuoso, que requiere manejo especializado para reducir riesgos de accidentes por inadecuada manipulación.

Cualquier forma farmacéutica, previa a su distribución comercial, debe pasar por fases de investigación (fase preclínica con ensayos *in vitro* y en animales de laboratorio; fase I-IV de investigación clínica: farmacocinética, farmacodinamia, dosis y farmacovigilancia) que aseguren la eficacia y seguridad a largo plazo. Esta información no está disponible para la solución de MSM, y únicamente se conoce por afirmación de su creador e impulsor Jim Humble, que el MSM ha tenido efectividad en pacientes con malaria tratados en África, y algunos reportes de testimonios aislados. Por lo anterior, se considera que no hay suficiente evidencia científica que avale su efectividad, por lo que deben demostrarse las propiedades farmacológicas y tóxicas *in vitro*. La finalidad del presente estudio fue determinar el efecto citotóxico e inmunomodulador de la solución, a partir del protocolo propuesto por Humble, utilizando metodologías previamente estandarizadas.

Actualmente se encuentra disponible gran variedad de información acerca del MSM lo que ha incrementado su auge popular. Sin embargo, no cuenta con respaldo científico, médico ni registros sanitarios avalados por entidades reguladoras internacionales. Este producto ha sido difundido como terapéutico en procesos autoinmunes, neoplasias e infecciones crónicas cuya patogénesis tiene un componente inmunológico comprobado, no obstante, al establecer su actividad y comportamiento *in vitro* se contribuye con datos objetivos en la información de seguridad y toxicidad potencial.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto citotóxico e inmunomodulador *in vitro* de la solución de ion clorito activado, conocido como “Milagroso Suplemento Mineral”.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto citotóxico de la solución de ion clorito activado sobre la viabilidad de *Artemia salina*, linfocitos humanos, bacterias y levaduras.
2. Evaluar la actividad inmunomoduladora de la solución de ion clorito sobre la actividad linfoproliferativa de linfocitos T y la capacidad hemolítica de proteínas del sistema de complemento.

VII. HIPÓTESIS

La solución de ion clorito activado no tiene actividad citotóxica sobre *Artemia salina*, linfocitos y eritrocitos humanos, afecta la viabilidad de bacterias y levaduras; muestra además efecto inmunomodulador *in vitro*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO Y MUESTRA

1. Universo de trabajo

Compuestos químicos con potencial farmacológico inmunomodulador.

2. Muestra

Solución de ion clorito activado (NaClO_2 en ácido cítrico).

B. RECURSOS HUMANOS

1. Investigador

Br. Pedro Pablo Martínez Rojas

2. Asesora

Licda. Ana Margarita Paz Morales, QB, MA.

3. Revisoras

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández, QB, MA.

Licda. Karla Josefina Lange Cruz, QB.

C. RECURSOS INSTITUCIONALES

- Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

D. MATERIALES

1. Equipo

- Autoclave marca Omrón
- Balanza analítica marca Mettler AE200
- Campana bacteriológica de flujo laminar, bioseguridad clase II, con luz UV-visible, modelo NU-813-400, marca Nuair
- Centrífuga de placas modelo IEC CL30, marca Termo Electrón Corporation
- Centrífuga modelo IEC CR-6000, marca International Equipment Company
- Estereoscopio marca Kyowa Optical

- Estufa eléctrica marca Thermo Scientific
- Incubadora modelo 6370, marca Fisher Scientific. Temperatura utilizada: 37°C
- Lector ELISA Stat Fax 2100
- Mechero de alcohol
- Microscopio binocular (10X), objetivos 4X(0.1), 10X(0.25), 40X(0.65) y 100X(1.25), modelo Labophot-2, marca Nikon
- Potenciómetro pH 330i / SET, marca WTW
- Refrigerador. Rango de temperatura: 2-10°C
- Vortex marca MaxiMix

2. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Ácido cítrico
- Agar Müeller Hinton
- Agar Sabouraud
- Agua desmineralizada estéril
- Amortiguador salino de Veronal concentrado cinco veces (VSB 5X)
- Anticuerpos contra eritrocitos de carnero (Amboceptor)
- Caldo Tripticasa Soya
- Clorito de sodio (NaClO_2) pureza 90% p/p
- Eosina Y hidrosoluble al 2%
- Eritrocitos de conejo y de carnero
- Etanol al 70%
- Furosemida
- Histopaque
- L-Glutamina 200 mM
- Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute, SIGMA).
- PBS (solución amortiguadora de fosfatos), pH 7.2 ± 0.2 a 25°C
- Sal de mar (cloruro de sodio $[\text{NaCl}]$ no yodado)
- SDS (dodecil sulfato sódico)
- Solución de Alsever

- Solución salina estéril isotónica 0.85%
- Solución stock de calcio/magnesio
- Solución de EGTA (ácido etilenglicol–bis(2-aminoetileter)N,N,N',N'-tetracético)
- Soluciones: VSB²⁺, EGTA-VSB, VSB⁰, EDTA-VSB.
- Suero humano
- Suero humano inactivado (30 minutos a 56°C)
- XTT (sal de tetrazolio)

3. Agentes biológicos

- Cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- Cepa de *Candida albicans* ATCC 1023
- Cepa de *Candida tropicalis* ATCC 131 2000
- Cepa de *Candida krusei*
- Cepa de *Candida glabrata*
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepa de *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
- Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Cepa de *Salmonella typhi* ATCC 14028
- Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Nauplios de *Artemia salina*

4. Materiales

- Asa bacteriológica no calibrada
- Bata blanca, manga larga
- Beakers de 250-1000 µL
- Bolsa roja para descarte de desechos
- Bomba de oxígeno para pecera
- Cajas de Petri simple
- Cajas de Petri cuádruple
- Cámara de Neubauer
- Estándar 4.0 de McFarland

- Frascos de tapón con rosca
- Guantes de látex descartables
- Hisopos de poliestireno estériles
- Jarra con candela
- Jeringas de 5.0 mL con aguja 21 X 1 ½
- Láminas portaobjetos 25.4 X 76.2 mm
- Lámpara de luz blanca
- Papel parafilm
- Pecera para cultivo de *Artemia salina*
- Pipetas automáticas de 10-100 µL
- Pipetas automáticas de 100-1000 µL
- Pipetas Pasteur
- Placas estériles de 96 pozos de fondo en U con tapadera
- Placas estériles de 96 pozos de fondo plano con tapadera
- Plantilla para siembra
- Puntas azules 100-1000 µL
- Puntas amarillas de 10-100 µL
- Tubos con tapón de rosca 15 mL
- Tubos cónicos de 15 mL
- Tubos cónicos de 50 mL
- Tubos Vacutainer con EDTA de 5 mL
- Tubos Vacutainer sin anticoagulante de 10 mL
- Viales de almacenamiento de 500 µL y 2000 µL

E. METODOLOGÍA

1. Preparación de la solución de ion clorito activado: “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) (Humble, 2006).
 - Solución #1: Se pesó 5.5 g de NaClO₂; se disolvieron en 15 mL de agua (0.4 g/mL).
 - Solución #2: Para emular el título detectado de ácido cítrico en el jugo de naranja, se pesaron 0.099 g de ácido cítrico y se disolvieron en 30 mL de agua.

- El equivalente de seis gotas de NaClO₂ en 15 mL de jugo de naranja se obtuvo mezclando 12 gotas (240 uL) de solución #1 en 30 mL de solución #2. Se evitó la exposición directa a la luz. La solución fue estable por 24 horas.

2. Actividad citotóxica sobre *Artemia salina* (Solís, 1993).

Ver diagrama de flujo resumido en anexo 1: Resultados gráficos del ensayo de actividad citotóxica sobre *Artemia salina*.

- Preparación del agua de mar
 - En un beaker se disolvieron 35 g de sal de mar en un litro de agua destilada.
 - Se hizo una marca en el vaso para indicar el volumen de agua.
 - Se hirvió por 30 minutos y se completó el volumen de agua que se evaporó.
 - Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar. La solución fue estable por un mes a temperatura de 6-8°C.
- Cultivo de *Artemia salina*
 - Se colocaron en un beaker 200 mL del agua de mar y se airearon por 30 minutos con bomba de oxígeno.
 - La mitad de una pecera fue forrada con papel aluminio (área cerrada).
 - Se colocó el agua en la pecera y se agregaron aproximadamente 40 mg de huevecillos en el área cerrada.
 - Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaron al área abierta de la pecera (lado con luz).
 - La pecera no se movió después de agregados los huevos, con esto se evitó que no pasaran del área cerrada y esto no permitiese el conteo de nauplios.
- Determinación de la citotoxicidad
 - Se agregaron por quintuplicado en una microplaca: 100 µL de MSM + 100 µL de agua de mar con 10-15 nauplios. Control negativo: 100 µl de agua de mar + 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios.
 - Se incubó a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
 - En el estereoscopio se contaron los nauplios muertos. Si se observaron nauplios muertos en el control negativo la prueba se consideró no válida y se repitió.

- Para calcular el porcentaje de nauplios muertos:
 - Se sumaron el número de nauplios muertos en los cinco pozos (X)
 - Se sumaron el número total de nauplios en los cinco pozos (Y)
 - Se aplicó la fórmula: $\% \text{ muertos} = (X/Y) * 100$

Interpretación

- Si el porcentaje de nauplios muertos fuese mayor del 50%, se realizarían diluciones para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y establecer el valor de DL_{50} por el modelo de regresión logarítmica.
- Si el porcentaje de muertos fuese menor del 50% la citotoxicidad se consideraría mayor de 0.4 g/mL.

3. Actividad antimicrobiana: bacterias (Mitscher, Leu, Bathal, Wu, Beal, & White, 1972).

Ver diagrama de flujo resumido en anexo 2: Resultados gráficos del ensayo de actividad antimicrobiana.

- Preparación de Agar-MSM
 - Se prepararon tubos con 9 mL de agar Müeller-Hinton.
 - Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos, se dejaron enfriar hasta 50°C.
 - Se vertió 1 mL de la solución de MSM en cajas de Petri.
 - El contenido de los tubos se vertió en cajas de Petri; se agitaron suavemente dejándolas solidificar. Los microorganismos se inocularon inmediatamente.
 - Se realizó un control de esterilidad incubando una caja del lote preparado a 36°C por 24 horas.
- Preparación del inóculo bacteriano
 - Cada cepa de bacteria a ensayar (*S.aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) se purificó tras inocular en un tubo con 8.0 mL de agar Müeller-Hinton. Se incubó a 36°C durante 24 horas.
 - Una asada del cultivo puro bacteriano se inoculó en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa Soya. Se incubó a 36°C durante 24 horas.
 - Se diluyó 0.05 mL de cada suspensión en 4.95 mL de solución salina isotónica estéril (dilución 1:100).

- Demostración de la actividad antibacteriana
 - Se inoculó en las cajas con Agar-MSM una asada de cada una de las diluciones de las bacterias (*S.aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) siguiendo el patrón de la plantilla. Se realizaron cinco repeticiones por microorganismo. Se dejaron reposar durante 10 minutos y se incubaron a 36°C durante 24 horas.
 - Se utilizó como control negativo 9 mL de agar Müeller-Hinton con 1.0 mL de etanol al 50%.

Interpretación:

- Actividad negativa: crecimiento a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: sin crecimiento a lo largo del inóculo, determinar concentración inhibitoria mínima (CIM).
- Contaminación: crecimiento fuera del inóculo.

4. Actividad antimicrobiana: levaduras (Burlingame, & Reddish, 1973).

Ver diagrama de flujo resumido en anexo 2: Resultados gráficos del ensayo de actividad antimicrobiana.

- Preparación de Agar-MSM
 - Se prepararon tubos con 9 mL de agar Müeller-Hinton.
 - Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos, se dejaron enfriar hasta 50°C.
 - Se vertió 1 mL de la solución de MSM en cajas de Petri.
 - El contenido de los tubos se vertió en las cajas de Petri; se agitaron suavemente dejándolas solidificar. Los microorganismos se inocularon inmediatamente.
 - Se realizó un control de esterilidad incubando una caja del lote preparado a 36°C por 24 horas.
- Preparación del inóculo de levaduras
 - Cada cepa de levadura a ensayar (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) se sembró en agar Sabouraud. Se incubó a 36°C durante 48-72 horas.

- Una asada del cultivo puro de cada levadura se inoculó en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa Soya. Se incubó a 36°C durante 48 horas.
- Se diluyó 0.5 mL de cada suspensión en 4.50 mL de solución salina isotónica estéril (dilución 1:10).
- Demostración de la actividad antilevadura
 - Se inoculó en las cajas con Agar-MMS una asada de cada una de las diluciones de levaduras a ensayar (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) siguiendo el patrón de la plantilla. Se realizaron cinco repeticiones por microorganismo. Se dejaron reposar durante 10 minutos y se incubaron a 36°C durante 48 horas.
 - Se utilizó como control negativo un sembrado en estrías de la levadura en agar Sabouraud.

Interpretación:

- Actividad negativa: crecimiento a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: sin crecimiento a lo largo del inóculo, determinar CIM.
- Contaminación: crecimiento fuera del inóculo.

5. Actividad antimicrobiana: concentración inhibitoria mínima (CIM)

(Mitscher, et al., 1972)

Ver diagrama de flujo en anexo 2: Resultados gráficos del ensayo de actividad antimicrobiana.

- Preparación de Agar-MSM
 - Se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 3.9 y 4.0 mL de agar Müller-Hinton.
 - Se esterilizar a 121°C durante 15 minutos, se dejaron enfriar a 50°C. Se agregó la solución de MSM en una caja de Petri cuadriplate de la siguiente manera:
 - 3.6 mL de agar + 0.4 mL de solución de MSM (1:10).
 - 3.8 mL de agar + 0.2 mL de solución de MSM (1:20).
 - 3.9 mL de agar + 0.1 mL de solución de MSM (1:40).
 - Un cuadrante con 4.0 mL de agar como control negativo.
 - Se dejó solidificar y se inoculó inmediatamente.
 - Se realizó control de esterilidad incubando una caja del lote a 36°C por 24 horas.

- Preparación del inóculo microbiano
 - Cada cepa de bacteria a ensayar (*S.aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) se purificó tras inocular en un tubo con 8.0 mL de agar Müeller-Hinton. Se incubó a 36°C durante 24 horas.
 - Cada cepa de levadura a ensayar (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) se sembró en agar Sabouraud. Se incubó a 36°C durante 48-72 horas.
 - Se inoculó una asada del cultivo puro de cada microorganismo en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya. Se incubó a 36°C durante 48 horas.
 - Se diluyó 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina isotónica estéril (1:100) para bacterias. Para levaduras, se diluyó 0.5 mL de la suspensión en 4.5 mL de solución salina isotónica estéril (1:10).

- Demostración de la actividad antibacteriana
 - Cada microorganismo se inoculó en caja de Petri cuadrilplate individual. Se realizaron tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja. Se dejó reposar durante 10 minutos e incubó a 36°C durante 24 horas para bacterias y durante 48 horas para levaduras.

Interpretación:

- Actividad negativa: crecimiento a lo largo de los inóculos.
- Actividad positiva: sin crecimiento a lo largo de los inóculos. Se reportó la dilución más alta en donde no hay crecimiento.
- Contaminación: crecimiento fuera de los inóculos.

6. Ensayo linfoproliferativo (Gaines, Andersson, & Biberfeld, 1996; Ramayo, Soba, & Mundo, 2005)

Ver diagrama de flujo resumido en anexo 3: Resultados gráficos del ensayo de viabilidad celular en linfocitos humanos.

- Aislamiento y preparación de linfocitos
 - En campana de flujo laminar se agregaron 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA sobre 5 mL de Histopaque utilizando una pipeta automática.

- Se centrifugó durante cinco minutos en frío (2-8 °C) a 2400 rpm y a temperatura ambiente por 15 minutos a la misma revolución.
 - La capa de linfocitos formada fue aspirada cuidadosamente. Se agregó 10 mL de PBS estéril.
 - La solución anterior se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 1400 rpm durante cinco minutos como parte del proceso de lavado.
 - El sobrenadante fue decantado y se repitió el procedimiento tres veces más.
 - Se resuspendieron las células en 2.0 mL de RPMI.
- **Conteo celular**
 - Se tomaron 10 μ L de la suspensión celular y se colocaron en la cámara de Neubauer para su recuento.
 - Las células fueron contadas en los cuatro cuadrantes de la cámara para glóbulos blancos; se ajustó la concentración de linfocitos con RPMI hasta contar 125 células por cuadrante para llegar a una concentración final de 5×10^6 células/mL.
 - Si hizo recambio de RPMI por el mismo volumen de RPMI-PBS, se centrifugó en frío (2-8°C) a 1400 rpm por cinco minutos.
- **Ensayo de viabilidad celular**
 - Los linfocitos fueron resuspendidos en medio de cultivo suplementado.
 - Se colocaron 80 μ L de la solución de linfocitos en cinco pocillos de las filas A-E de una placa de fondo plano estéril.
 - El primer pocillo de cada fila se dejó como control de viabilidad, en él se agregaron 20 μ L de RPMI. En los cuatro pocillos restantes se agregó 20 μ L de la solución de MSM. Se incubó 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.
 - Se tomó una alícuota de 25 μ L y se colocó en un portaobjetos. Se colocó una gota de solución de eosina Y acuosa al 2%, se mezcló cuidadosamente y se montó un cubreobjetos. Se observó al microscopio en 40X.
 - Se calculó el porcentaje de células acidófilas. Una acidofilia mayor del 60% se consideraría en inviabilidad por pérdida de permeabilidad de las membranas; el reto proliferativo no sería llevado a cabo.

- Reto linfoproliferativo
 - Los linfocitos fueron resuspendidos en medio de cultivo suplementado.
 - Se colocaron 80 μ L de la solución de linfocitos en cinco pocillos de las filas A-E de una placa de fondo plano estéril.
 - El primer pocillo de cada fila se dejó como control de viabilidad, en él se agregaron 20 μ L de RPMI. En los cuatro pocillos restantes se agregó 20 μ L de la solución de MMS. Se incubó 37°C y 5% de CO₂ durante cuatro días.
 - Se agregó 25 μ L de la solución de XTT a cada uno de los pozos y se incubó a 37°C durante cuatro horas cubriendo la placa con papel aluminio para evitar contacto directo con la luz.
 - Se agregaron 25 μ L de SDS como solución de parada.
 - Se leyó a 450 nm, comparando viabilidad celular con el aumento de absorbancia.

- 7. Ensayo hemolítico para evaluar la actividad del complemento (Kuipers, Aerts, Sjöholm, Harmsen, & Dijk, 2002; Rose, Hamilton, & Detrick, 2002)

Ver diagrama de flujo resumido en anexo 4: Resultados gráficos del ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos.

 - Determinación de la capacidad hemolítica intrínseca de la solución de MSM.
 - Obtención de sangre desfibrinada
 - Se prepararon tubos de 5 mL, de tapón de rosca y con tres perlas de vidrio. Se esterilizaron a 121°C por 15 minutos.
 - Se extrajeron 5 mL de sangre periférica, por venipunción libre de hemólisis, proveniente de un donador sano voluntario.
 - Inmediatamente, en campana de flujo de laminar se agregaron 5 mL de sangre sobre las paredes de un tubo. Una vez cerrado, se agitó cuidadosamente por 10 minutos hasta evidenciar la formación de un coágulo de fibrina.
 - La sangre desfibrinada fue trasvasada a un tubo limpio y estéril.
 - Preparación de solución de eritrocitos humanos al 5%
 - Se tomaron tres gotas de sangre desfibrinada y se agregaron sobre 5 mL de solución salina isotónica estéril.

- Se centrifugó en frío a 1400 rpm por cinco minutos. Se evidenció ausencia de hemólisis.
 - El sobrenadante fue decantado y el botón eritrocitario resuspendido en 5 mL de solución salina isotónica estéril. Se centrifugó en frío a 1400 rpm por cinco minutos (se repitió el procedimiento dos veces más).
 - El botón eritrocitario fue suavemente resuspendido. Se agregó una gota del botón eritrocitario en 19 gotas de solución salina estéril, se homogenizó suavemente (solución de eritrocitos al 5%).
- Preparación de placa
- Se agregaron 50 μ L de agua desmineralizada estéril a los pozos de las filas A y D de una placa de fondo redondo (100% de hemólisis).
 - Se agregaron 50 μ L de solución de MSM a los pozos de las filas B y E de una placa de fondo redondo.
 - Se agregaron 50 μ L de solución salina isotónica estéril a los pozos de las filas C y F de una placa de fondo redondo (0% de hemólisis).
 - La placa fue cubierta con papel aluminio y se incubó a 37°C por 30 minutos.
 - Se agregaron a todos los pozos de la placa 50 μ L de la solución al 5% de eritrocitos humanos, se cubrió nuevamente y se incubó a 37°C por 60 minutos.
 - Se centrifugó a 2500 rpm por dos minutos.
- Medición de hemólisis
- Se colocó 200 μ L de agua desmineralizada en pozos de placa de fondo plano.
 - Se agregaron 50 μ L de los sobrenadantes de la placa anteriormente centrifugada en la placa de fondo plano, manteniendo el orden original.
 - Se leyeron absorbancias a 405 nm.
 - Se calculó el porcentaje de hemólisis. Una hemólisis mayor del 50% se consideraría en capacidad hemolítica intrínseca de la solución MSM; el ensayo hemolítico del sistema de complemento no sería llevado a cabo.
- Determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento
 - Sensibilización y preparación de eritrocitos de carnero

- Se mezclaron 2 mL de eritrocitos de carnero en 2 mL de solución de Alsever. Se centrifugó en frío (2-8°C) a 2500 rpm durante cinco minutos.
 - El sobrenadante fue decantado y el botón eritrocitario resuspendido en 10 mL de solución salina. Se centrifugó en frío a 1400 rpm por cinco minutos (se repitió el procedimiento dos veces más). El botón eritrocitario se mantuvo sobre hielo.
 - Se resuspendieron 200 µL del botón eritrocitario en 9.8 mL de VSB²⁺.
 - Para la sensibilización, a 8 mL de la suspensión anterior se agregaron 7 mL de VSB²⁺ y 1 mL de la solución de trabajo de Amboceptor.
 - Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se lavó tres veces con VSB²⁺. El volumen decantado se reconstituyó con 16 mL de VSB²⁺.
 - Una concentración de 4x10⁸ células/mL fue preparada luego de contar 162 eritrocitos en cada cuadrante de rojos de la cámara de Neubauer. Se mantuvo en frío hasta su utilización.
 - Se agregó 75 µL de la solución de MSM en los pozos de la fila A utilizando placas de fondo redondo. Se realizaron diluciones seriadas 1:3 con 50 µL de VSB²⁺ (desde la fila B a G en la placa).
- Preparación de controles para la medición de actividad sérica y hemólisis
- Para los pozos H1-H6 se agregaron 50 µL de VSB²⁺.
 - Para los pozos H1-H3 se agregaron 50 µL de solución de suero humano activo.
 - Para los pozos H4-H6 se agregaron 50 µL de la solución de suero humano inactivado (incubado a 56°C por 30 minutos).
 - Para los pozos H7-H9 se agregaron 100 µL de VSB²⁺ (0% de hemólisis).
 - Para los pozos H10-H12 se agregaron 100 µL de agua desmineralizada (100% de hemólisis).
- Preparación de placa
- Se agregaron 50 µL de la solución de suero humano inactivado a los pozos blancos de muestra (columnas 3, 6, 9, y 12 de filas A-G).
 - Se agregaron 50 µL de la solución de suero humano activo a todos los pozos con diluciones de la solución MSM.

- La placa fue cubierta con papel aluminio y se incubó a 37°C por 30 minutos.
- Se agregaron a todos los pozos de la placa 50 µL de la suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados previamente, se cubrió nuevamente y se incubó a 37°C por 60 minutos.
- Se centrifugó a 2500 rpm por dos minutos.
- Medición de hemólisis
 - Se colocó 200 µL de agua desmineralizada en pozos de placa de fondo plano.
 - Se agregaron 50 µL de los sobrenadantes de la placa anteriormente centrifugada en la placa de fondo plano, manteniendo el orden original.
 - Se leyeron absorbancias a 405 nm.
- Determinación hemolítica para la actividad de la vía alterna del complemento
 - Sensibilización y preparación de eritrocitos de sangre de conejo
 - Se lavaron tres veces los eritrocitos de conejo en solución salina estéril.
 - Se preparó una suspensión de eritrocitos de conejo con EGTA-VB a una concentración de 1.15×10^8 células/mL; se contaron 42 eritrocitos en cada cuadrante de glóbulos rojos en la cámara de Neubauer. La solución se mantuvo en hielo hasta su utilización.
 - Se agregaron 75 µL de solución de MSM en los pozos de la fila A. Diluciones seriadas 1:3 fueron realizadas con 50 µL de EGTA-VB (desde la fila B a G).
 - Preparación de controles para la medición de actividad sérica y hemólisis
 - Para los pozos H1-H6 se agregaron 50 µL de EGTA-VB.
 - Para los pozos H1-H3 se agregaron 25 µL de solución de suero humano activo.
 - Para los pozos H4-H6 se agregaron 25 µL de la solución de suero inactivado.
 - Para los pozos H7-H9 se agregaron 100 µL de EGTA-VB (0% de hemólisis).
 - Para los pozos H10-H12 se agregaron 100 µL de agua desmineralizada (100% de hemólisis).
 - Preparación de la placa
 - Se agregaron 25 µL de la solución de trabajo de suero humano inactivado a los pozos blancos de muestra (columnas 3, 6, 9, y 12 de filas A-G).

- Se agregaron 25 μL de la solución de suero humano activo a todos los pozos con diluciones de la solución MSM.
 - La placa fue cubierta con papel aluminio y se incubó a 37°C por 30 minutos.
 - Se agregó a todos los pozos de la placa 25 μL de la suspensión de eritrocitos de conejo sensibilizados previamente, se cubrió e incubó a 37°C por 30 minutos.
 - Se centrifugó a 2500 rpm por dos minutos.
- Medición de hemólisis
- Se colocaron 200 μL de agua desmineralizada en los pozos de una placa de fondo plano.
 - Se agregaron 50 μL de los sobrenadantes de la placa anteriormente centrifugada en la placa de fondo plano, se mantuvo el orden original.
 - Se leyeron absorbancias a 405 nm.
- Cálculos
- % de lisis (determinación de actividad sérica)

$$\% = \frac{\text{DO}_{405}\text{promedio (H1,H2,H3)} - \text{DO}_{405}\text{promedio(H4,H5,H6)}}{\text{DO}_{405}\text{promedio (H10,H11,H12)} - \text{DO}_{405}\text{promedio (H7,H8,H9)}} \times 100$$

- Actividad inhibitoria de la muestra versus control
 - Ejemplo: para la concentración más alta de muestra 1 (A1, A2, A3)

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{\text{DO}_{405}\text{promedio (A1,A2)} - \text{DO}_{405}\text{(A3)}}{\text{DO}_{405}\text{promedio(H1,H2,H3)} - \text{DO}_{405}\text{promedio (H4,H5,H6)}} \times 100$$

- Determinación de CH_{50}

La CH_{50} fue la concentración menor de la solución de MSM en la cual se obtuvo 50% de inhibición o estimulación del complemento.

F. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Tipo de estudio: Cuasi-experimental.
2. Variables
 - a. Variable independiente: Concentración de la solución de ion clorito activado.

- b. Variable dependiente: Actividad citotóxica e inmunomoduladora.
3. Ensayos
- a. Actividad citotóxica sobre *Artemia salina*. Unidades experimentales: Nauplios de *Artemia salina*. Respuesta a medir: Citotoxicidad celular (porcentaje de mortalidad). Número de réplicas: cinco por conveniencia.
- b. Actividad antimicrobiana. Unidades experimentales: Bacterias y Levaduras. Respuesta a medir: Actividad microbicida (presencia o ausencia de crecimiento microbiano). Número de réplicas: cinco por conveniencia.
- c. Ensayo cualitativo de viabilidad celular por el método de tinción con eosina Y. Unidades experimentales: Linfocitos humanos. Respuesta a medir: Viabilidad celular (porcentaje de acidofilia). Número de réplicas: cinco por conveniencia.
- d. Ensayo linfoproliferativo. Unidades experimentales: Linfocitos humanos. Respuesta a medir: Proliferación celular (estimulación o inhibición). Número de réplicas: cinco por conveniencia, se realizaría dependiendo del resultado del ensayo de viabilidad celular.
- e. Ensayo de la capacidad hemolítica intrínseca de MSM. Unidades experimentales: Eritrocitos humanos. Respuesta a medir: Actividad hemolítica de la solución de estudio (porcentaje de hemólisis). Número de réplicas: cinco por conveniencia.
- f. Ensayo hemolítico para determinar la actividad del complemento. Unidades experimentales: Presencia de proteínas del Sistema de Complemento. Respuesta a medir: Actividad hemolítica (estimulación o inhibición) por acción de proteínas del Sistema de Complemento. Número de réplicas: cinco por conveniencia, se realizaría dependiendo del resultado del ensayo de la capacidad hemolítica intrínseca de la solución de MSM.

G. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Análisis de resultados
- a. Para la determinación de la actividad citotóxica sobre *Artemia salina* se probó la solución de MSM a una concentración inicial 0.4 g/mL (Humble, 2006). En caso de observarse actividad positiva se determinaría CIM haciendo diluciones seriadas a partir

de la concentración inicial. Se utilizó una prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de 0.05, en donde H_0 : probabilidad (p) ≤ 0.5 correspondió a no inhibición de viabilidad o actividad negativa y H_a : $p > 0.5$ que correspondió a inhibición de viabilidad o actividad positiva. Para rechazar H_0 se debió tener cinco éxitos de inhibición de crecimiento. Se calculó el valor de la dosis letal (DL_{50}) e intervalos de confianza al 95% mediante el modelo de regresión logarítmica.

- b. La actividad antimicrobiana se determinó a partir del uso de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de 0.05, donde H_0 : $p \leq 0.5$ correspondió a no inhibición de crecimiento microbiano o actividad negativa y H_a : $p > 0.5$ que correspondió a inhibición de crecimiento microbiano o actividad positiva. Para rechazar H_0 y concluir actividad positiva se debió tener cinco éxitos de inhibición de crecimiento.
- c. La viabilidad de linfocitos se determinó con base en el porcentaje de acidofilia en una alícuota de células expuestas a la solución de MSM. Se realizó una prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de 0.05, donde H_0 : $p \leq 0.5$ correspondió a que no tiene efecto sobre la viabilidad celular o actividad negativa y H_a : $p > 0.5$ que correspondió a que tiene efecto sobre la viabilidad celular o actividad positiva. Para rechazar H_0 y concluir actividad que induce inviabilidad celular se debió tener cinco éxitos de eosinofilia mayor del 60% en el extendido celular, esto sería indicativo para no realizar el ensayo de linfoproliferación.
- d. La capacidad hemolítica intrínseca de la solución de MSM se determinó con base en el porcentaje de hemólisis en una solución de eritrocitos humanos al 5% expuesta a la solución de MSM. Se realizó una prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de 0.05, donde H_0 : $p \leq 0.5$ correspondió a la ausencia de efecto hemolítico sobre los eritrocitos o actividad negativa y H_a : $p > 0.5$ que correspondió a la evidencia de efecto hemolítico o actividad positiva. Para rechazar H_0 y concluir actividad que induce hemólisis de forma intrínseca se debió tener cinco éxitos de hemólisis mayor del 50% entre la relación de absorbancias con MSM y agua destilada (100% hemólisis), esto sería indicativo para no realizar el ensayo de hemólisis del sistema de complemento.

e. La actividad estimuladora o inhibidora de la linfoproliferación de linfocitos T y hemólisis del sistema de complemento de la solución de MSM se realizó con una prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de 0.05, donde $H_0: p \leq 0.5$ correspondió a actividad negativa (sin alteración) y $H_a: p > 0.5$ que correspondió a actividad positiva (estimuladora o inhibidora).

i. Ensayo linfoproliferativo

Los resultados se evaluaron de acuerdo a la siguiente escala, en donde la actividad estimuladora se identificó como E y la actividad inhibidora como I:

- Porcentaje de estimulación o inhibición de 0-25% no significativo = inalterado.
- Porcentaje de estimulación de 25-30% = E_{\pm}
- Porcentaje de estimulación de 31-100% = E_{+}
- Porcentaje de estimulación de 101-200% = E_{++}
- Porcentaje de estimulación de $>201\%$ = E_{+++}
- Porcentaje de inhibición de 25-30% = I_{\pm}
- Porcentaje de inhibición de 31-100% = I_{+}
- Porcentaje de inhibición de 101-200% = I_{++}
- Porcentaje de inhibición de $>201\%$ = I_{+++}

Los resultados a medir fueron positivos si la solución estimuló (E) o inhibió (I) la proliferación de linfocitos y negativo si no se evidenció alteración de la proliferación de los mismos. Para rechazar H_0 y concluir actividad positiva se debió tener cinco éxitos de resultados positivos.

ii. Ensayo hemolítico para determinar la actividad del complemento

Los resultados a medir fueron positivos si la solución estimuló la hemólisis (en 50% de la concentración de hemoglobina) comparado frente al resultado de la actividad sérica y si la concentración de la solución de MSM para obtener el CH_{50} fue menor de 0.4 g/mL. Si la concentración de hemoglobina liberada comparada con la actividad sérica y el control negativo se mantuvo inalterada, los resultados se consideraron negativos. Para rechazar H_0 y concluir actividad positiva se debió tener cinco éxitos de resultados positivos.

IX. RESULTADOS

- A. Preparación de la solución de ion clorito activado: “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) (Humble, 2006).

Las características observables de la solución activa de MSM (0.4 g/mL) que se preparó, previo a cada uno de los ensayos, fueron: incolora, exotérmica leve, de olor característico a la solución de hipoclorito de sodio comercial y pH de 2.6. Se mantuvo fuera de contacto de la luz y del ambiente externo. Estas características se mantuvieron por aproximadamente 4 horas. Posterior a este tiempo, se observó la formación de una solución amarilla con sedimentación de NaClO₂. Ninguno de los ensayos utilizó solución de MSM en este estado.

- B. Actividad citotóxica sobre *Artemia salina* (Solís, 1993).

Los nauplios de *Artemia salina* se enfrentaron a la solución de MSM (0.4 g/mL) obteniéndose 100% de mortalidad en las cinco repeticiones realizadas. Para la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM), se evidenció 5% de mortalidad a partir de la dilución 1:128. En el cuadro 1 se muestra los resultados del ensayo.

Cuadro 1. Actividad citotóxica de MSM sobre *Artemia salina*.

Ensayo	Control negativo	MSM (0.4 g/mL)	MSM (diluciones)								
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Interpretación: CIM = $6.25 * 10^{-3}$ g/mL (6.25 mg/mL)

(-): actividad citotóxica negativa; (+): actividad citotóxica positiva
Fuente: Datos experimentales

La CIM se estableció en 6.25 mg/mL. Se calculó la DL₅₀ a partir de una regresión logarítmica, determinándose una concentración de 4.48 mg/mL (IC_{95%} 4.44 - 4.53 mg/mL). El valor del coeficiente de correlación (r²) de 0.53 estableció una relación moderadamente fuerte entre las variables de porcentaje de mortalidad y concentración del MSM; el valor de

$p = 0.013$ indicó que la actividad citotóxica fue significativa. En el cuadro 2 se muestra los resultados del análisis en el sistema Statgraphics Centurion XVI (ver anexo 1: Resultados gráficos del ensayo de actividad citotóxica sobre *Artemia salina*).

Cuadro 2. Determinación de DL_{50} por modelo de regresión logarítmica: porcentaje mortalidad versus concentración de MSM derivado de los resultados de CIM.

Modelo (regresión logarítmica): Log(Concentración)			
	Coeficientes	Error estándar	p
Intercepto	139.09	9.60	0.013
Pendiente	16.47	1.75	0.013
% mortalidad = $139.09 + 16.47 * \ln(\text{Concentración})$; $r^2 = 0.53$			

Fuente: Datos experimentales; Statgraphics Centurion XVI (versión 16.1.15)

C. Actividad antimicrobiana: bacterias (Mitscher, Leu, Bathal, Wu, Beal, & White, 1972).

Bacterias Gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*) fueron enfrentadas a la solución de MSM (0.4 g/mL). No se observó inhibición en el crecimiento microbiano en los inóculos de todas las repeticiones, lo que se interpretó como no actividad antibacteriana significativa ($p > 0.05$). No se realizó determinación de CIM. En el cuadro 3 se muestra los resultados del ensayo (ver anexo 2: Resultados gráficos de los ensayos de actividad antimicrobiana).

Cuadro 3. Actividad antimicrobiana de MSM sobre bacterias.

Microorganismo	Actividad antimicrobiana por ensayo				
	A	B	C	D	E
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-

(-): actividad antimicrobiana negativa; (+): actividad antimicrobiana positiva

Fuente: Datos experimentales

D. Actividad antimicrobiana: levaduras (Burlingame, & Reddish, 1973).

Cuatro especies de levaduras del género *Candida* fueron enfrentadas a la solución de MSM (0.4 g/mL). No se observó inhibición en el crecimiento microbiano en los inóculos de todas las repeticiones, lo que se interpretó como no actividad antifúngica (en levaduras) significativa ($p > 0.05$). No se realizó determinación de CIM. En el cuadro 4 se muestra los resultados (ver anexo 2: Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana).

Cuadro 4. Actividad antimicrobiana de MSM sobre levaduras.

Microorganismo	Actividad antimicrobiana por ensayo				
	A	B	C	D	E
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-

(-): actividad antimicrobiana negativa; (+): actividad antimicrobiana positiva

Fuente: Datos experimentales

E. Viabilidad celular y ensayo linfoproliferativo (Gaines, Andersson, & Biberfeld, 1996; Ramayo, Soba, & Mundo, 2005).

Se determinó la viabilidad de linfocitos (5×10^6 células/mL) frente a la solución del MSM (0.4 g/mL). Se observó 100% de eosinofilia en todas las repeticiones, que se interpretó como actividad citotóxica positiva sobre la viabilidad celular. Por lo anterior, no se evidenció actividad linfoproliferativa significativa ($p > 0.05$). En el cuadro 5 se muestra los resultados del ensayo (ver anexo 3: Resultados gráficos del ensayo de viabilidad celular en linfocitos).

Cuadro 5. Viabilidad celular de linfocitos en solución de MSM.

Ensayo	Control (-)	MSM (0.4 g/mL)		Linfoproliferación
	% viabilidad	% acidofilia	% viabilidad	
A	100	100	0	No determinada
B	100	100	0	No determinada
C	100	100	0	No determinada
D	100	100	0	No determinada
E	100	100	0	No determinada

% viabilidad: porcentaje de células vivas; % acidofilia: porcentaje de células muertas.

Fuente: Datos experimentales

- F. Ensayo hemolítico para evaluar la actividad del complemento (Kuipers, Aerts, Sjöholm, Harmsen, & Dijk, 2002; Rose, Hamilton, & Detrick, 2002).

Se determinó el porcentaje de hemólisis en una solución de eritrocitos humanos (5%) expuesta a la solución de MSM (0.4 g/mL). Se observó una hemólisis del 100% comparado con el control positivo en todas las repeticiones del ensayo, lo cual se interpretó como efecto hemolítico intrínseco de la solución. Por lo anterior, no se evidenció actividad hemolítica por el sistema del complemento significativa ($p > 0.05$). En el cuadro 6 se muestra los resultados del ensayo (ver anexo 4: Resultados gráficos del ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos).

Cuadro 6. Capacidad hemolítica intrínseca de la solución MSM.

Ensayo	Control (+) % hemólisis	Control (-) % hemólisis	MSM (0.4 g/mL) % hemólisis	Hemólisis por Complemento
A	100	0	100	No determinada
B	100	0	100	No determinada
C	100	0	100	No determinada
D	100	0	100	No determinada
E	100	0	100	No determinada

Fuente: Datos experimentales

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La solución activa del Milagroso Suplemento Mineral (MSM) demostró en este estudio ser altamente tóxica (CIM = 6.25 mg/mL; DL₅₀ estimada en 4.48 mg/mL [IC_{95%} 4.44 - 4.53 mg/mL]) según la escala de toxicidad aproximada propuesta por Sweet (1997; ver anexo 1). Paralelamente, no se evidenció actividad antimicrobiana e inmunomoduladora, dado que para esto último, las unidades y respuestas a medir fueron blanco de la misma toxicidad. Por lo anterior, la hipótesis de este estudio fue rechazada.

Todos los ensayos se realizaron luego de activar una solución de NaClO₂ (0.4 g/mL) en medio ácido para favorecer la formación de ion ClO₂⁻. Lo anterior a partir del protocolo de uso “El milagroso suplemento mineral del siglo 21”, en donde se indica que en estas condiciones, la solución ha demostrado efectos terapéuticos. La solución de MSM preparada y lista para activar, se encuentra disponible al público, en formato de venta libre en la ciudad de México. Para este estudio, la solución fue preparada a partir de una concentración de 90% p/p de NaClO₂, por lo que el reactivo podría contener 10% de trazas de cloratos, fosfatos y/o sulfuros. La presencia de estos residuos debe ser considerado en la estabilidad de la solución y en los hallazgos obtenidos. Sin embargo, tras la revisión de la hoja de seguridad del NaClO₂ de uno de los distribuidores más importantes de reactivos químicos a nivel regional (México, Centro y Sur América), la pureza del producto es la disponible actualmente en el mercado (Humble, 2006; Merck Group, 2000).

Para la activación de la solución se empleó ácido cítrico para emular *in vitro* la concentración y las características ácidas del jugo de naranja, que es el excipiente recomendado, dejándose fuera compuestos como ácido ascórbico y vitamina D que tienen mayor variabilidad en productos naturales y comerciales. Por lo anterior, el efecto de la solución de MSM depende del medio en que se activa. El protocolo permite el uso de jugo de limón, toronja y vinagre (ácido acético) (Humble, 2006; Kimball, 1991; Graumlich, Marcy, & Adams, 1986).

El ion ClO₂⁻ no es estable en un medio ácido, manteniendo un intercambio electrónico que induce a la producción de ion ClO₃⁻ y radicales libres como el ion superóxido (O₂⁻). Este estado de reacción dinámico y reversible le confiere a la solución características oxidativas y corrosivas. Esto fue corroborado por las características físicas macroscópicas reportadas y por los cambios observados en aproximadamente cuatro horas posterior a la preparación, que incluyó cambio en

la coloración y en la formación de precipitado. Por lo anterior, es posible inferir que la solución es hipertónica fuertemente oxidativa (Avello, 2006; Dietrich, Orr, Gallagher, & Hoehn, 1992).

Las propiedades inherentes de la solución de MSM, *per se*, fueron determinantes en la capacidad citotóxica que presenta. Macroscópicamente, se evidenció muerte inmediata de los nauplios de *Artemia salina* al contacto hasta una dilución de 1:128 (CIM = 6.25 mg/mL) en que la mortalidad se dio en un 5% (cuadro 1). El análisis de regresión logarítmica estableció una concentración de 4.48 mg/mL (IC_{95%} 4.44 - 4.53 mg/mL) suficiente para ocasionar la muerte del 50% de la población de nauplios; la concentración establecida por el protocolo (0.4 g/mL) es 89 veces mayor que la DL₅₀ establecida. Con estos valores, al interpretar la escala aproximada de toxicidad de Hodge y Sterner (anexo 1), la solución de MSM se clasifica como nivel uno (extremadamente tóxica) y aplicando la escala de Gosselin, que estima una probable dosis letal oral en humanos con base en la primera escala, la solución se clasifica como nivel seis (súper tóxica) y se requiere una ingesta menor de siete gotas para inducir muerte celular. Para que esta inferencia tenga mayor validez, se requieren de ensayos en ratas para establecer una adecuada relación de dosis/peso, lo cual estaba fuera de los objetivos de este estudio. En la misma línea, los valores de $p = 0.013$ y $r^2 = 0.53$ (cuadro 2) permiten inferir que la actividad citotóxica es significativa y que la misma depende de la concentración de la solución (Sweet, 1997).

Por las características citotóxicas evidenciadas por la solución activa de MSM, se esperaba observar actividad antimicrobiana en bacterias y levaduras, sin embargo, no se evidenció inhibición en el crecimiento microbiano por lo que se estableció que la actividad antimicrobiana no fue significativa ($p > 0.05$, cuadro 3-4). Lo anterior se consideró como un resultado falso negativo (Avello, 2006; Vecchia, Altieri, & Tavani, 2001).

Ante la evidencia de actividad antimicrobiana no significativa contra una alta toxicidad demostrada, se analizaron las variables que podrían influir en este hallazgo, que incluyeron los factores físico-químicos del ensayo y la metodología empleada *per se*. La técnica de difusión en agar fue empleada como tamizaje estandarizado para la evidencia de efecto antimicrobiano; la misma es descrita a partir de la ley de Fick que establece de forma cuantitativa la difusión de materia como consecuencia estadística del movimiento al azar de las partículas y está determinada por la magnitud del gradiente, el peso molecular, solubilidad, distancia, superficie, viscosidad y porosidad del medio de difusión. En esa línea, el efecto de la temperatura del agar

(42°C) al momento de mezclarlo con la solución de MSM no se consideró determinante para afectar la estabilidad molecular, dado que entre las características físicoquímicas de los compuestos inorgánicos clorados se han descrito puntos de fusión por encima de 250°C; al contrario, esta temperatura favorecería la cinética y formación constante de iones superóxido. Por otro lado, el NaClO₂ es considerado de bajo peso molecular (90.45 g/mol) por lo que su difusión no se vería limitada. Es importante considerar que la reacción de disociación del NaClO₂ es reversible y la cinética iónica constante, por lo que la viscosidad del agar no favorecería el movimiento iónico al azar (King, & Brown, 2001; Milligen, Bons, Carreras, & Sánchez, 2005).

Por otro lado, el medio ácido en que se activa la solución de MSM fue determinante para su acción (pH 2.6), no obstante, al mezclarse en proporción 1:10 con el agar Mueller-Hinton cuya composición es rica en peptonas y por ende, una solución con pH neutro a ligeramente básico (7.3 ± 0.1), la reacción de óxido-reducción se neutralizó dando lugar a la formación de agua y clorato de sodio. Por lo anterior, para utilizar la prueba de tamizaje por difusión en agar se debió considerar si la actividad de la molécula de estudio era dependiente del pH, esta limitación no contemplada no permitió demostrar la actividad antimicrobiana de la solución de MSM (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966; Cockerill, et al., 2012).

Paralelamente y como se describió anteriormente, la actividad inmunomoduladora de la solución de MSM no fue significativa ($p > 0.05$), puesto que los componentes celulares (linfocitos y eritrocitos) y humorales (proteínas del sistema de complemento) a evaluar fueron blancos de la toxicidad intrínseca presentada (cuadro 5 y 6). Los linfocitos humanos tienen la capacidad *in vitro* de adaptar su ciclo celular para inducir replicación de material genético (fase S) y mitosis en presencia de sustancias mitogénicas, por lo que la finalidad del ensayo fue verificar la capacidad de la solución para activar o no dicho mecanismo, dado que han sido descritos sus efectos terapéuticos en procesos que tienen una implicación clave de la respuesta inmune celular. Derivado de los resultados obtenidos en el ensayo sobre *Artemia salina* (cuadro 1), se estableció realizar el ensayo de viabilidad celular con eosina Y al 2%, bajo las mismas condiciones requeridas para el ensayo de linfoproliferación con la finalidad de verificar si la solución de MSM, en la concentración de 0.4 g/mL, alteraba células a través del daño a la permeabilidad de membranas. El hallazgo de inviabilidad del 100% confirmó el efecto citotóxico

de la solución por su capacidad oxidativa, estableciendo actividad inmunomoduladora no significativa a nivel celular ($p > 0.05$; cuadro 5) (Gaines, Andersson, & Biberfeld, 1996).

La acidez de la solución de MSM (pH 2.6) y las propiedades citotóxicas presentadas fueron determinantes para no realizar el ensayo para evaluar la capacidad de la solución de activar o inhibir la hemólisis inducida por las proteínas del sistema de complemento. Por principio bioquímico, la acidez produciría la desnaturalización de proteínas tras contacto y por lo tanto se tendrían resultados falsamente negativos; por otro lado, la solución al ser hipertónica y oxidativa induciría hemólisis eritrocitaria, la cual fue evidenciada en 100% al enfrentar la solución con eritrocitos humanos al 5%, que de no considerarse, se hubiesen reportado resultados falsamente positivos. Por lo anterior, no se evidenció actividad inmunomoduladora significativa a nivel humoral ($p > 0.05$; cuadro 6). Todos los hallazgos obtenidos permiten inferir que la solución de MSM, preparada de acuerdo con el protocolo de Humble, es altamente tóxica sin efectos inmunomoduladores *in vitro* (Rose, Hamilton, & Detrick, 2002).

La solución de MSM carece de aprobación por la FDA y para poder ser comercializada debe ser clasificada en la categoría de suplementos nutricionales de acuerdo con la legislación de esta agencia reguladora. Este producto es manejado, de acuerdo con la información y documentación disponible, como método alternativo para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas metabólicas, neoplásicas e infecciosas basándose en los principios homeopáticos de dosis mínima, homotoxicología e individualidad medicamentosa. Los resultados obtenidos y presentados en este estudio sólo pretenden establecer el comportamiento de la solución *in vitro* como un antecedente para la validación de su uso seguro con conocimiento de sus potenciales riesgos (Zhang, 2009).

XI. CONCLUSIONES

- La solución de “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) presentó actividad citotóxica significativa (CIM = 6.25 mg/mL; DL₅₀ 4.48 mg/mL [IC_{95%} 4.44 - 4.53 mg/mL]; $p = 0.013$). La concentración de la solución propuesta por el protocolo (0.4 g/mL) es 89 veces mayor que la DL₅₀ establecida en este estudio.
- La solución de MSM no presentó actividad antimicrobiana e inmunomoduladora significativa ($p > 0.05$).
- La actividad inmunomoduladora no fue demostrada debido a que los componentes celulares y humorales a medir fueron blanco de la toxicidad intrínseca de la solución MSM.
- El efecto citotóxico de la solución fue confirmado a partir de la demostración (100%) de la alteración de membranas y la inducción de hemólisis sobre linfocitos y eritrocitos humanos, respectivamente.

XII. RECOMENDACIONES

- Confirmar la DL_{50} de la solución del “Milagroso Suplemento Mineral” (MSM) a través de otros ensayos *in vitro* que incluyan ratas o ratones para establecer una adecuada relación de dosis/peso.
- Estandarizar un ensayo de CIM utilizando la técnica micrométrica por espectrofotometría para establecer la actividad antimicrobiana (bacterias y levaduras) de la solución del MSM.
- Evaluar la actividad citotóxica e inmunomoduladora de la solución MSM, ajustada a un pH ácido entre 5.5 y 6.5, que sea compatible con la viabilidad celular y estabilidad de proteínas.
- Determinar la citotoxicidad y la actividad inmunomoduladora utilizando como principio activo la solución del MSM, preparada y lista para activar, disponible comercialmente en México y que es la propuesta en el protocolo de Jim Humble.
- Los hallazgos de toxicidad y ausencia de actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de este estudio deben interpretarse en el contexto *in vitro* de la metodología empleada.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed A., Saha B., Patwardhan A., Shivprasad S., & Nandi D. (2009). The mayor players in adaptive immunity. *Resonance*, 1, 455-471.
- Aieta E., & Berg J. (1986). A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *Journal of American Water Works Association*, 78, 62-72.
- Avello SM. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 3, 161-172.
- Barry M., & Bleackley R. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Review Immunology*, 2, 401-409.
- Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., & Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Bonilla F., & Oettgen H. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 33-40.
- Buckner J. (2010). Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Review Immunology*, 10, 849-859.
- Burlingame E., & Reddish G. (1973). Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *Journal Laboratory Clinical Medicine*, 14, 649-653.
- Bussiere JL. (2010). Immunotoxicology of Biological Response Modifiers. *Comprehensive Toxicology*, 5, 521-529.
- Carroll M. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunology. *Nature Immunology*, 5: 981-986.
- Chaplin D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 3-23.

- Cockerill F., Wikler M., Alder J., Dudley M., Eliopoulos G., Ferraro MJ., et al. (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement*. Atlanta. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohen BH. (2010). Pharmacologic effects on mitochondrial function. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16, 189-199.
- Dalmazzo R. (2009). Intoxicación por ingesta de medicamentos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 20(6), 878-882.
- Deininger R., Ancheta A., & Ziegler A. (1998). *Dióxido de cloro: Calidad de Agua, desinfección efectiva*. Organización Panamericana de la Salud. CEPIS.
- Dietrich A., Orr M., Gallagher D., & Hoehn R. (1992). Tastes and odors associated with chlorine dioxide. *Journal of American Water Works Association*, 84, 82-88.
- Eltzschig H., & Carmeliet P. (2011). Hypoxia and inflammation. *New England Journal of Medicine*, 364, 656-665.
- Feghali C., & Wright T. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, 2, 12-26.
- Fujita T., Endo Y., & Nonaka N. (2004). Primitive complement system-recognition and activation. *Molecular Immunology*, 41, 103-111.
- Gaines H., Andersson L., & Biberfeld G. (1996). A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell in whole blood culture by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 195, 63-72.
- Gan L., Zhang S., Yang X., & Xu H. (2004). Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. *International Immunopharmacology*, 4, 563-569.
- García P. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 102, 91-159.

- Graumlich TR., Marcy JE., & Adams JP. (1986). Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3(34), 402-405.
- Henao S., Sierra C., & Gaitán J. (2003). Actividad bactericida del ácido hipocloroso. *Medicina*, 51, 136-142.
- Humble J. (2006). *Milagroso Suplemento Mineral del Siglo 21*. México.
- Jaeschke H., Gores G., Cederbaum A., Hinson J., & Lemasters J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65, 166-176.
- James T. (2006). The immune response: basic and clinical principles. *Journal of the American Medical Association*, 295(12), 1456-1465.
- Jiang H., & Chess L. (2006). Regulation of immune responses by T cells. *New England Journal of Medicine*, 354, 1166-1176.
- Junli H., Li W., Nenqi R., Fang M., & Li J. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research*, 31, 607-613.
- Kimball D. (1991). *Citrus processing: quality control and technology*. New York. Van Nostrand Reinhold.
- King A., & Brown DF. (2001). Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 71-76.
- Kuipers S., Aerts P., Sjöholm A., Harmsen T., & Dijk H. (2002). A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin (MBL) levels in human serum. *Journal of Immunological Methods*, 268, 149-157.
- Ladies G., & Woolhiser M. (2007). Mechanisms of Immunotoxicity. En R. Luebke, R. House, & I. Kimber (3^a ed.). *Immunotoxicology and Immunofarmacology*. (pp. 42-69). Boca Raton. CRC Press.

- Merck Group. (2000). *ChemDat – The Merck Chemical Database*. Life Science & Analytics.
- Milligen P., Bons D., Carreras B., & Sánchez R. (2005). On the applicability of Fick's law to diffusion in homogeneous systems. *European Journal of Physics*, 26, 913-925.
- Mitscher L., Leu R., Bathala M., Wu W., Beal J., & White R. (1972). Antimicrobial agents from higher plants: introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35, 157-166.
- Moser B., & Willimann K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 6, 84-89.
- Munné P., Saenz J., Izura J., Burillo G., & Nogué S. (2003). Intoxicaciones Medicamentosas (II). *Toxicología Clínica: Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(1), 65-70.
- Muñoz J. (2005). Terapia inmunomoduladora en el manejo del paciente con trasplante renal: el papel de los medicamentos antiproliferativos. *Fármacos*, 17, 1-2.
- Nanji A., & Hiller-Sturmhöfel S. (1997). Apoptosis and Necrosis. Two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol health & research world*, 21(4), 326-330.
- Nelson B. (2004). IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *Journal of Immunology*, 172, 3983-88.
- Ogata N., Shibata T. (2008). Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against Influenza A virus infection. *Journal of General Virology*, 89, 60-67.
- Ooi V., & Liu F. (2000). Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715-729.
- Oses I., Burillo G., & Munné P. (2003). Intoxicaciones Medicamentosas (I). *Toxicología Clínica: Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 49-55.
- Ramayo L., Soba M., & Mundo S. (2005). Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*. *Inmunología Veterinaria*, 7, 1-9.

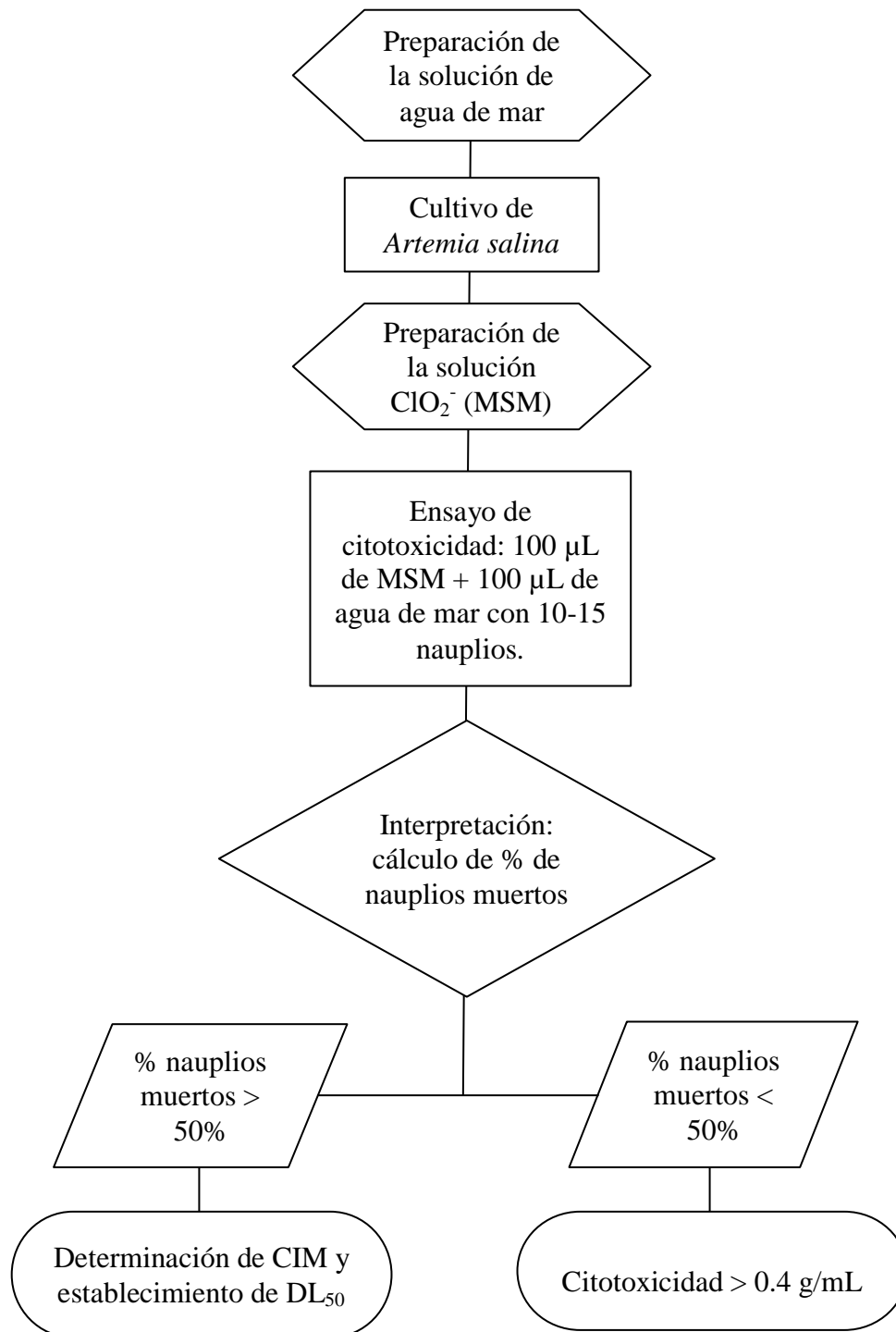
- Ramírez R., Carracedo J., Moreno C., & Guerra F. (1999). Apoptosis y enfermedad. *Alergología e Inmunología Clínica*, 14(6), 367-374.
- Ramos C., Asgari Z., Liu E., Yvon E., Heslop H., Rooney C., et al. (2010). An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies. *Stem Cells*, 28, 1107-1115.
- Romero J. (2005). Bases biológicas de la toxicidad en tejidos sanos de la combinación radioquimioterapia. *Oncología*, 28, 53-55.
- Rose N., Hamilton R., & Detrick B. (2002). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. USA. ASM Press.
- Sachana M., & Hargreaves A. (2007). Toxicological testing: *in vitro* and *in vivo* models. En R. Gupta (2 ed.) *Toxicology: Basic and Clinical Principles* (pp. 15-22). USA. Academic Press.
- Satar S., Kayraldiz A., Rencuzogullari E., Karakoc E., Sebe A., Avci A., et al. (2009). Genotoxicity and cytotoxicity among patients diagnosed with organophosphate poisoning. *Bratisl Lek Listy*, 110, 476-479.
- Sell S., & Max EE. (2001). All about B cells. En S. Sell (6ª ed.). *Immunology, immunopathology, and immunity*. (pp 101-105). Washington. ASM Press.
- Seltman S. (2011). Self-regulation of the immune system suppresses defense against cancer. *German Cancer Research Center*, 69, 44-46.
- Solís P. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Médica*, 59, 250-252.
- Spencer S., & Sorger P. (2011). Measuring and modeling apoptosis in single cells. *Cell*, 144, 926-939.
- Strainic M., Liu J., Huang D., An F., Lalli P., Muqim N., et al. (2008). Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity*. 28, 425-435.

- Suhre K., Shin S., Petersen A., Mohnhey R., Meredith D., Wagele B., et al. (2011). Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*, 477, 54-60.
- Sweet D. (1997). *Registry of toxic effects of chemical substances*. US. Department of health and human services. Public Health Service.
- Trowsdale J., & Parham P. (2004). Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *European Journal of Immunology*, 34, 7-17.
- Vecchia C., Altieri A., & Tavani A. (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of italian studies. *European Journal of Nutrition*, 40, 261-267.
- Walport M. (2002). Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research*, 4(3), 279-293.
- Zhang X. (2009). *Safety issues in the preparation of homeopathic medicines*. Spain. World Health Organization.

XIV. ANEXOS

A. Anexo 1: Gráficos del ensayo de actividad citotóxica sobre *Artemia salina*

1. Diagrama de flujo resumido del ensayo de citotoxicidad.



2. Análisis de regresión lineal en programa Statgraphics Centurion XVI.

- Variable dependiente: %Mortalidad; variable independiente: Concentración
- Estimación de fórmula (Log-X): $Y = a + b \cdot \ln(X)$
- Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>p</i>
Intercepto	139.09	9.60	12.51	0.013
Pendiente	16.47	1.74	4.36	0.013

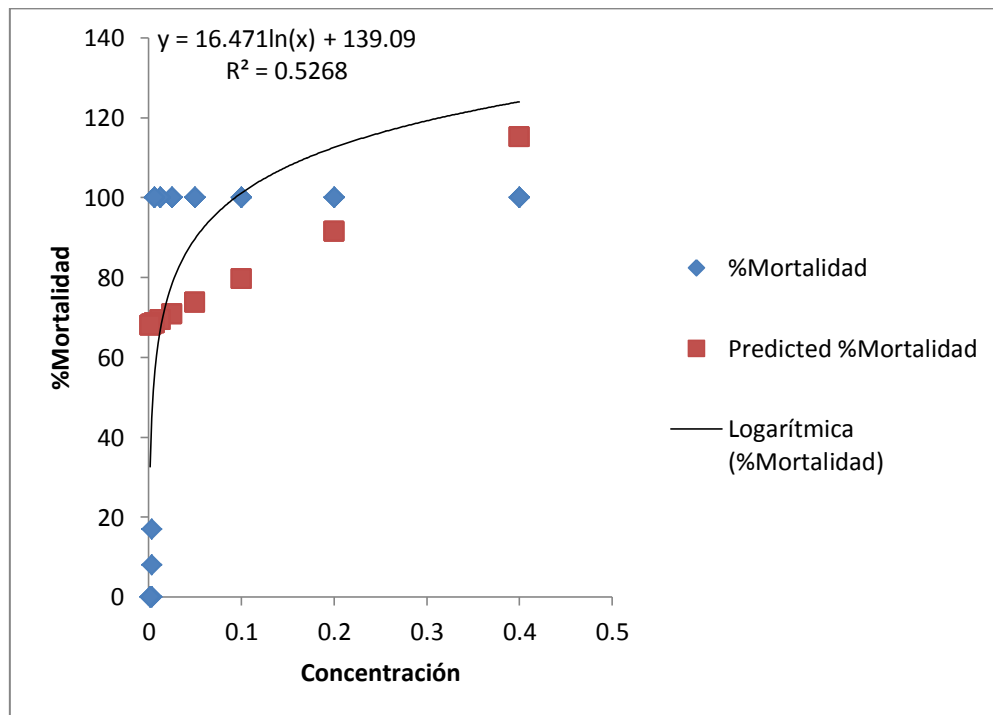
- Fórmula

La ecuación del modelo ajustado para describir la relación entre variables es:

$$\%Mortalidad = 139.09 + 16.47 * \ln(\text{Concentración}) \quad r^2 = 0.53$$

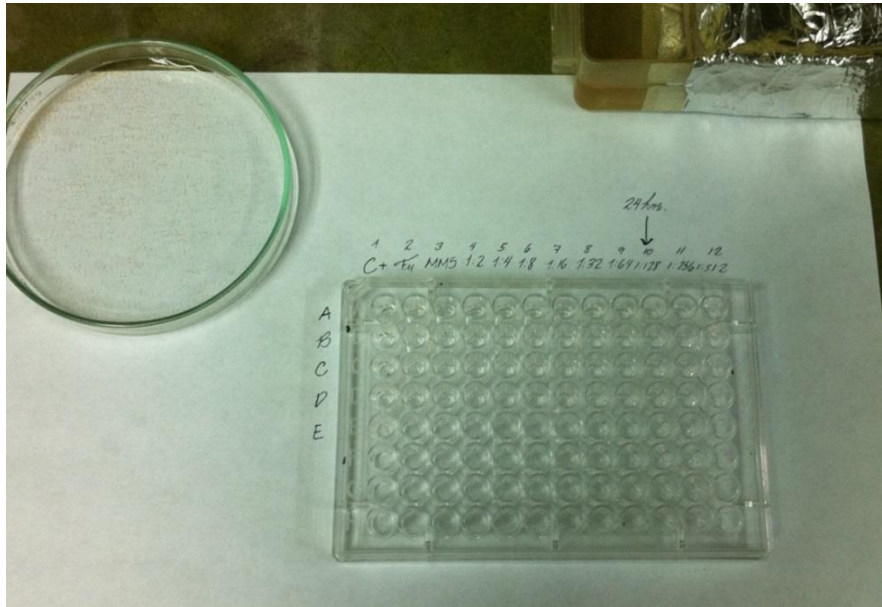
- Interpretación

Puesto que el valor p en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una asociación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95%. El coeficiente de correlación es igual a 0.53, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.



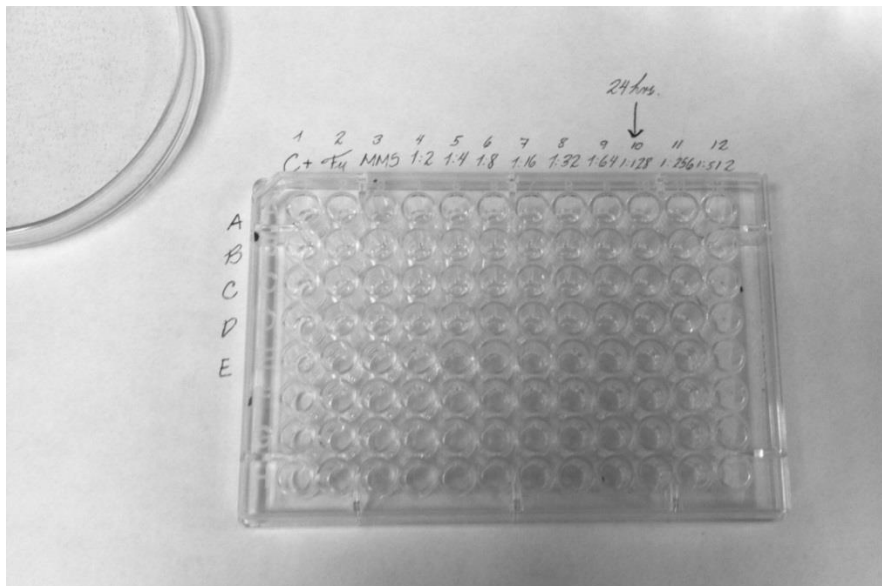
3. Dossier fotográfico

Fotografía A.2.1 Ensayo de citotoxicidad sobre *Artemia salina*.



Fuente: Datos experimentales

Fotografía A.2.2 Dilución 1:128 en que se evidenció viabilidad a las 24 horas.



Fuente: Datos experimentales

4. Estimación de toxicidad: Escala de Hodge y Sterner (DL_{50} *in vitro*)

Rata oral (DL_{50})			
Clase	Nombre	Dosis estimada (mg/Kg)	Dosis letal (humanos)
1	Extremadamente tóxico	< 1	< 1 mL
2	Altamente tóxico	1 – 50	4 mL
3	Moderadamente tóxico	50 – 500	30 mL
4	Ligeramente tóxico	500 – 5,000	600 mL
5	Prácticamente no-tóxico	5,000 - 15,000	1,000 mL
6	Relativamente nocivo	> 15,000	> 1,000 mL

Fuente: Sweet D. (1997). *Registry of toxic effects of chemical substances*. US. Department of health and human services. Public Health Service.

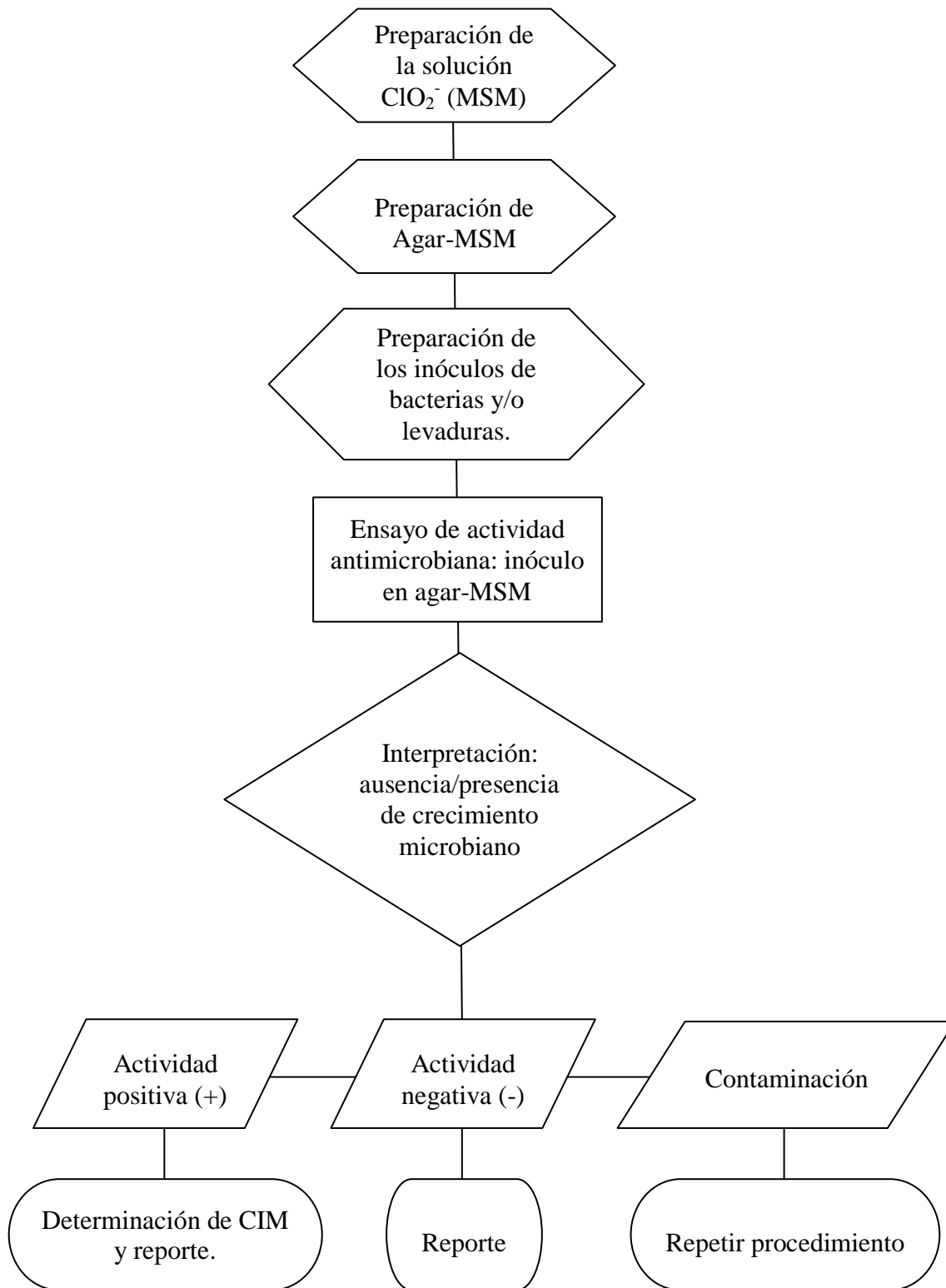
5. Estimación de toxicidad: Escala de Gosselin (DL_{50} soluciones acuosas en humanos)

Probable DL_{50} (correlación con Escala de Hodge y Sterner)			
Clase	Nombre	DL_{50} (mg/Kg)	Dosis letal (humanos)
6	Súper tóxico	< 1	< 1 mL
5	Extremadamente tóxico	1 – 50	4 mL
4	Muy tóxico	50 – 500	30 mL
3	Moderadamente tóxico	500 - 5,000	30 - 600 mL
2	Ligeramente tóxico	5,000 - 15,000	600 - 1,200 mL
1	No tóxico	>15,000	> 1,200 mL

Fuente: Sweet D. (1997). *Registry of toxic effects of chemical substances*. US. Department of health and human services. Public Health Service.

B. Anexo 2: Gráficos de los ensayos de actividad antimicrobiana

1. Diagrama de flujo resumido del ensayo de actividad antimicrobiana



2. Dossier fotográfico

Fotografía B.2.1 Preparación para el ensayo de actividad antimicrobiana.



Fuente: Datos experimentales

Fotografía B.2.2 Resultados del ensayo de actividad antimicrobiana en bacterias.



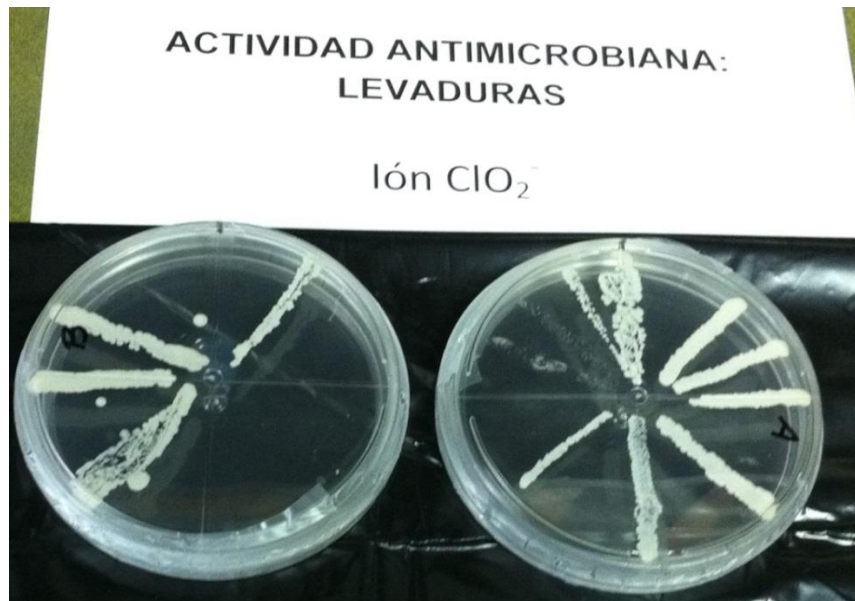
Fuente: Datos experimentales

Fotografía B.2.3 Resultados del ensayo en bacterias y control (+) de crecimiento.



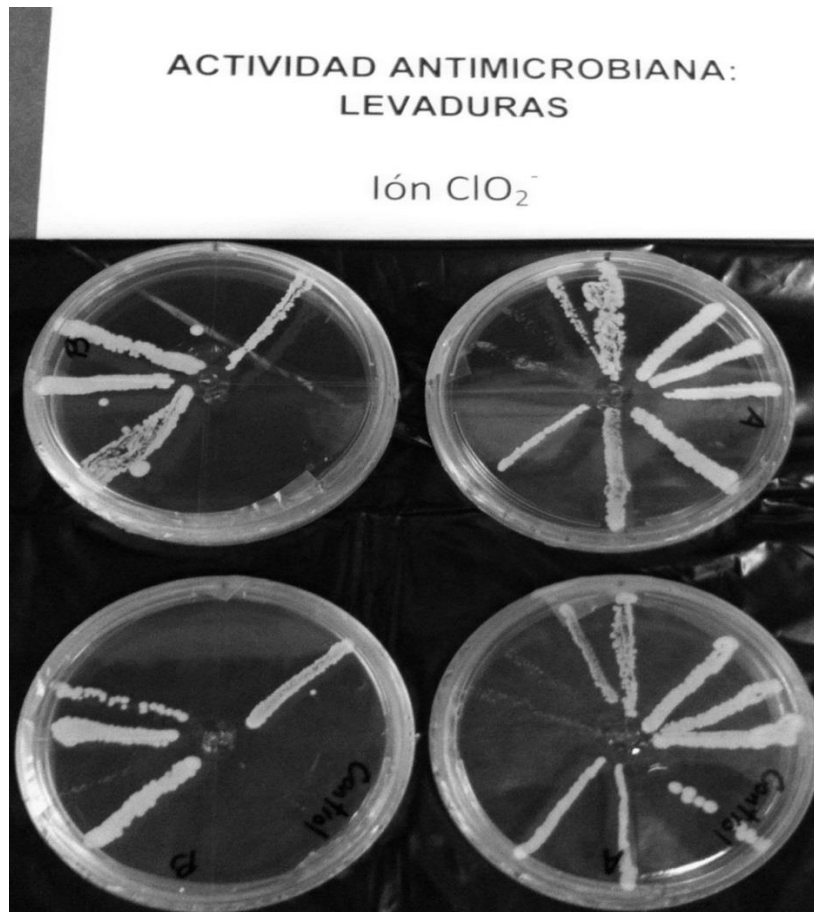
Fuente: Datos experimentales

Fotografía B.2.4 Resultados del ensayo de actividad antimicrobiana en levaduras.



Fuente: Datos experimentales

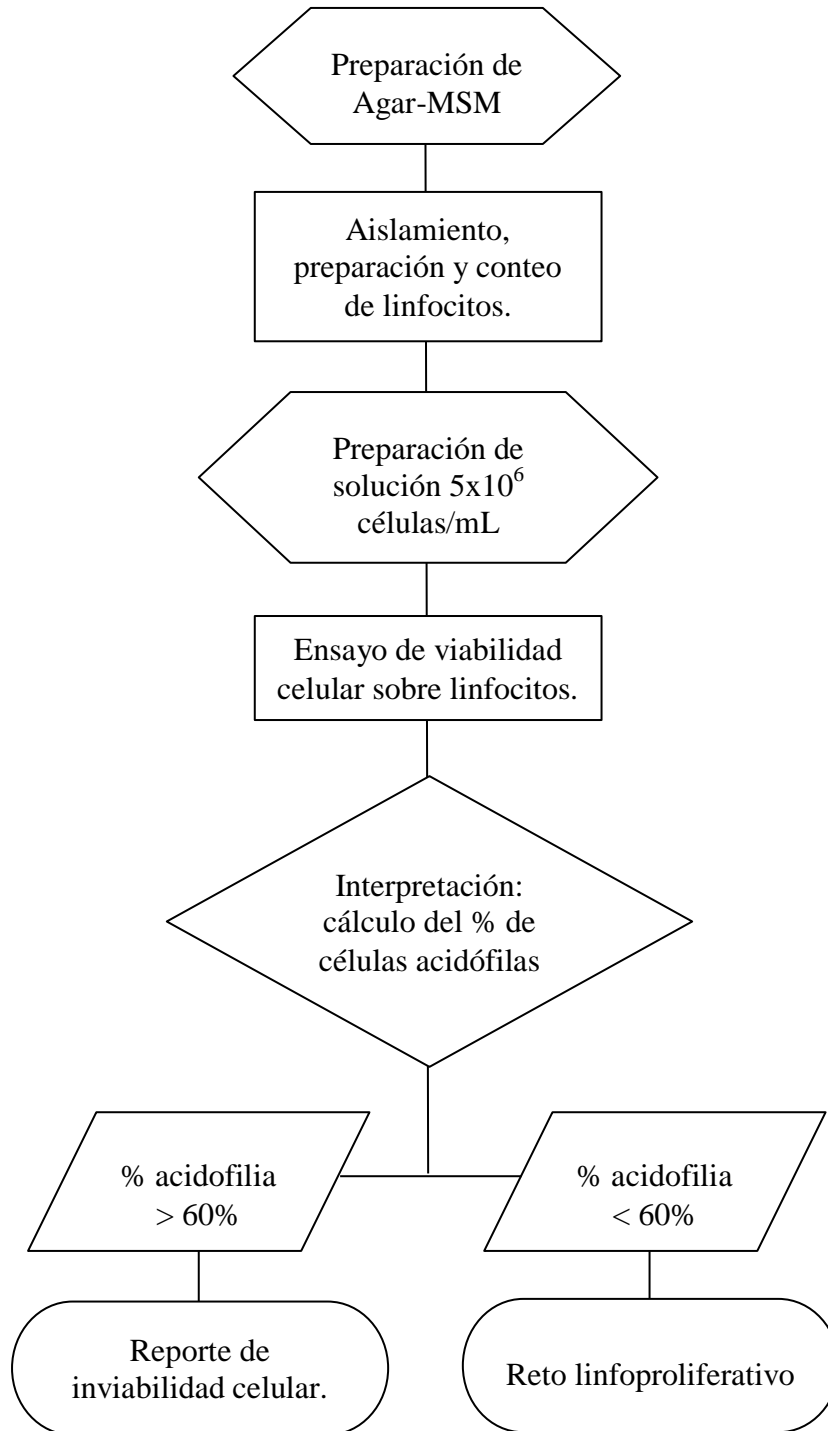
Fotografía B.2.5 Resultados del ensayo en levaduras y control (+) de crecimiento.



Fuente: Datos experimentales

C. Anexo 3: Gráficos de los ensayos de viabilidad celular en linfocitos humanos

1. Diagrama de flujo resumido del ensayo de viabilidad celular.



2. Dossier fotográfico

Fotografía C.2.1 Preparación para la separación de linfocitos humanos.



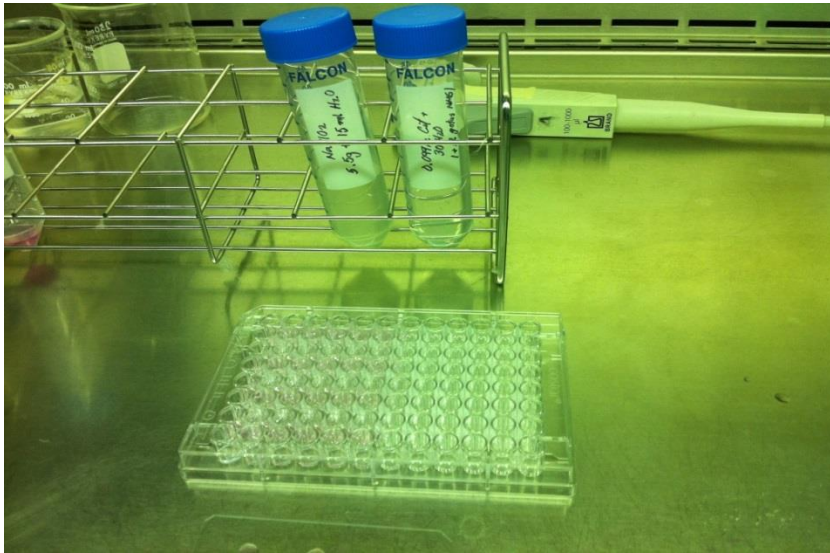
Fuente: Datos experimentales

Fotografía C.2.2 Separación de linfocitos humanos.



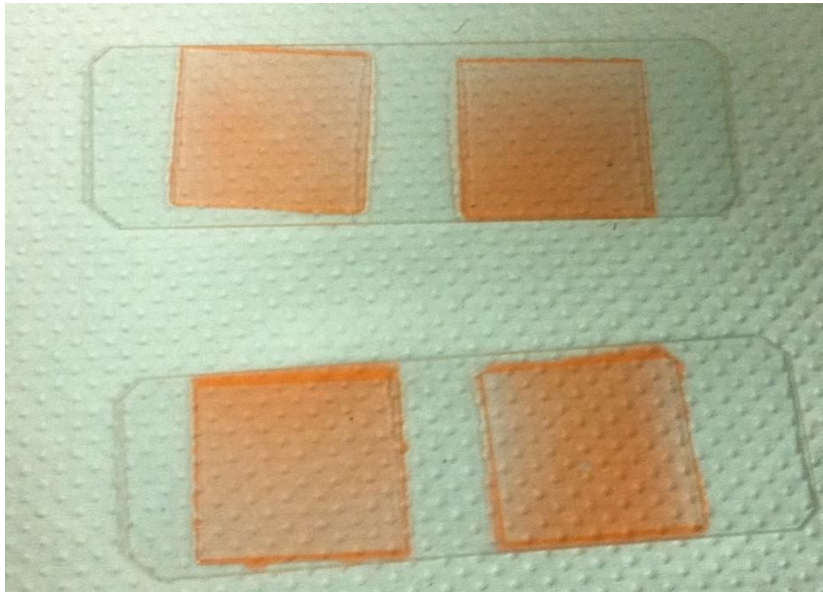
Fuente: Datos experimentales

Fotografía C.2.3 Enfrentamiento de la solución MSM con linfocitos humanos.



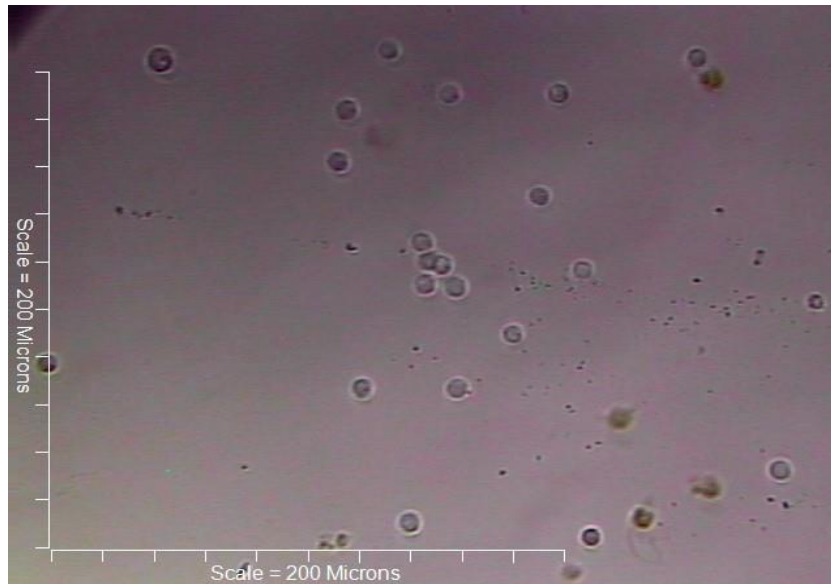
Fuente: Datos experimentales

Fotografía C.2.4 Preparación de láminas con eosina Y 2%.



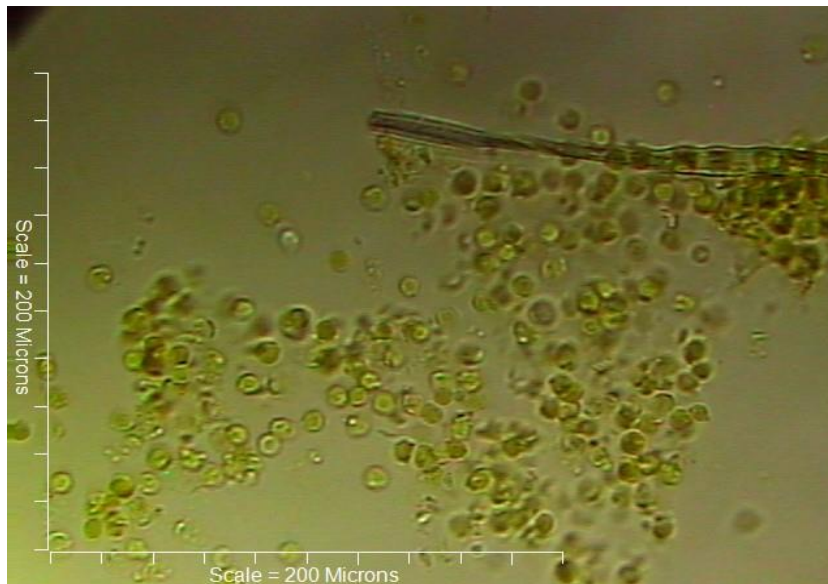
Fuente: Datos experimentales

Fotografía C.2.5 Resultados del ensayo de viabilidad celular: linfocitos control (-).



Fuente: Datos experimentales

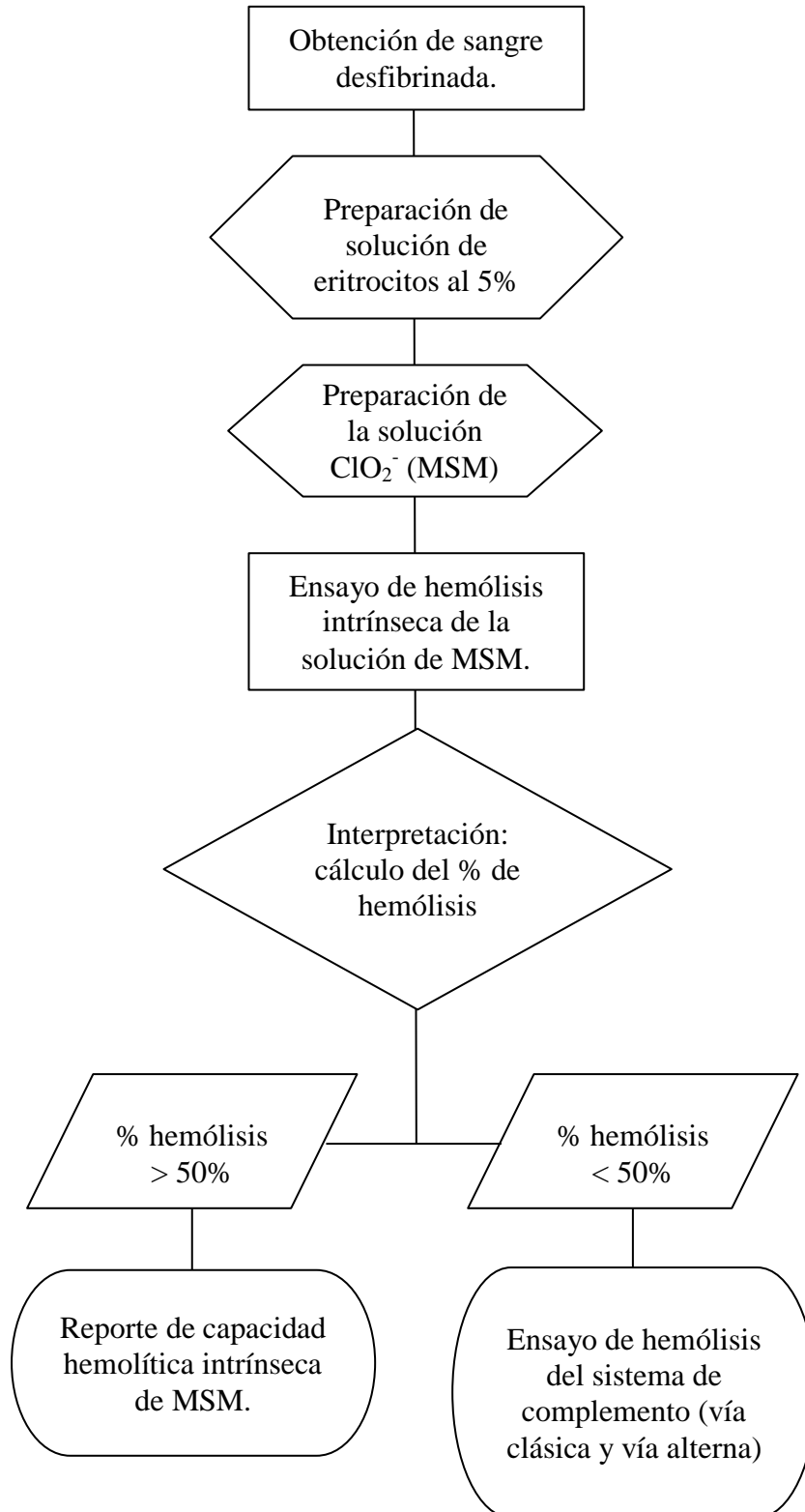
Fotografía C.2.6 Resultados del ensayo de viabilidad celular: linfocitos en MSM.



Fuente: Datos experimentales

D. Anexo 4: Gráficos del ensayo de hemólisis en eritrocitos

1. Diagrama de flujo resumido del ensayo de hemólisis intrínseca de MSM.



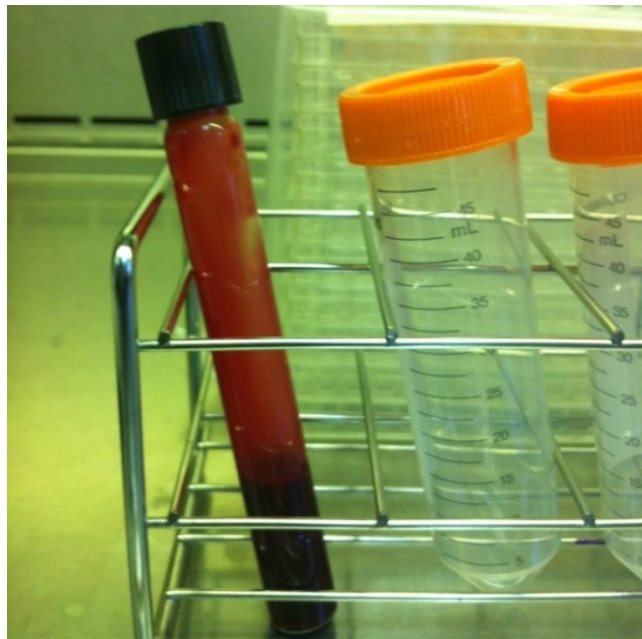
2. Dossier fotográfico

Fotografía D.2.1 Determinación del pH de la solución de MSM.



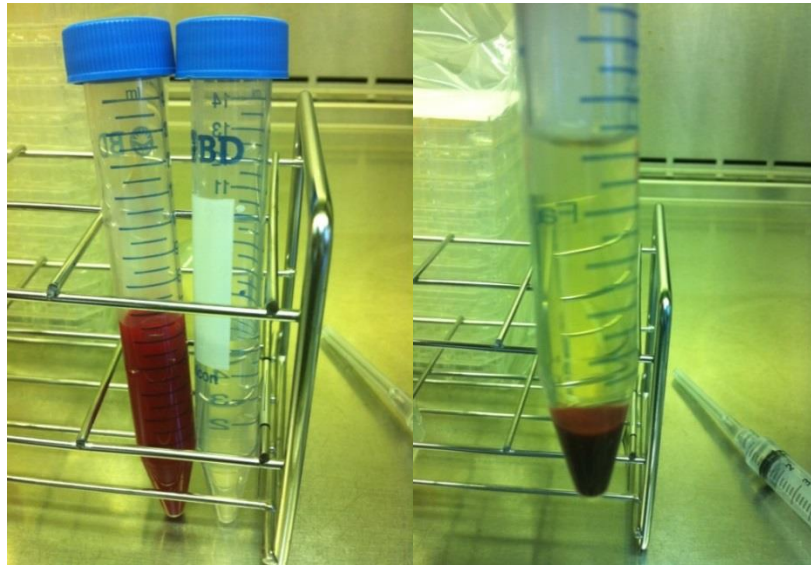
Fuente: Datos experimentales

Fotografía D.2.2 Desfibrinación de sangre previa realización de ensayo hemolítico.



Fuente: Datos experimentales

Fotografía D.2.3 Lavado eritrocitario con solución salina estéril 0.85%.



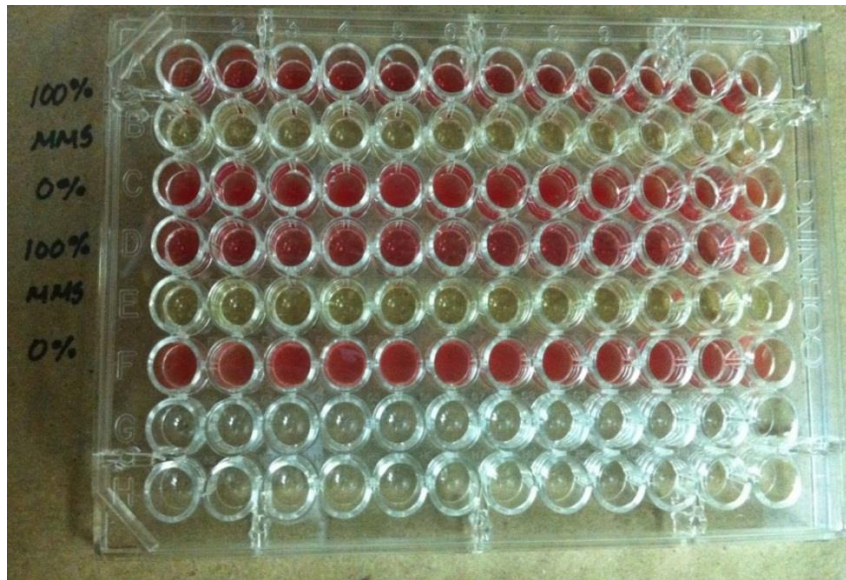
Fuente: Datos experimentales

Fotografía D.2.4 Preparación de solución de eritrocitos al 5%.



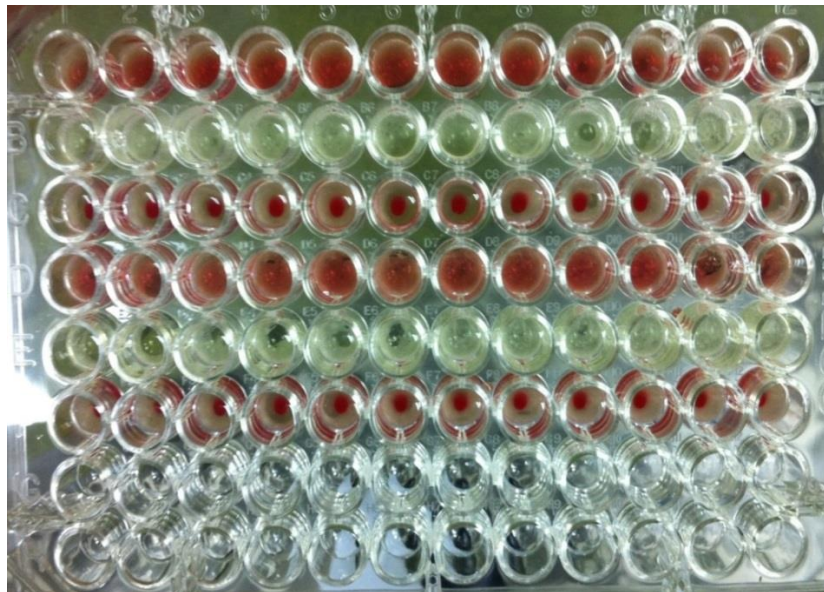
Fuente: Datos experimentales

Fotografía D.2.5 Enfrentamiento de la solución MMS con eritrocitos al 5%.



Fuente: Datos experimentales

Fotografía D.2.6 Resultados del ensayo de hemólisis sobre eritrocitos al 5%.



Fuente: Datos experimentales