

Actividad antiviral del extracto de *Punica granatum* L. (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C

Janet Morffi Figueroa, Blanca del Rosario Peña Núñez* y Suset Oropesa.**

Dpto. de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana. *Dpto. de Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. **Laboratorio Nacional de Influenza, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Cuba.

Recibido: 26 de noviembre de 2004. Aceptado: 20 de junio de 2005.

Palabras clave: influenza, antiviral, gripe, DIE_{50} , título hemaglutinante.
Key words: influenza, antiviral, flu, hemagglutinant title, DIE_{50} .

RESUMEN. El extracto de *Punica granatum* L. (BLBu) preparado a partir de frutos maduros es comúnmente utilizado en la medicina tradicional cubana para el tratamiento de enfermedades respiratorias. En este estudio, ratones hembras de la línea Balb/C de 4 semanas de edad, fueron organizados en cuatro grupos de 20 animales cada uno. Los grupos I, II y III recibieron una dosis única de 25 μ L de 10 DIE_{50} de virus por cada fosa nasal, el grupo IV funcionó como control negativo de virus, pues solo recibió la máxima dosis de BLBu (175 mg/kg de peso). La dosificación de este extracto para el tratamiento diario de los diferentes grupos comenzó 24 h posteriores a la infección, con la administración de 50 μ L de una dosis diaria de 50 y 175 mg/kg de peso de BLBu, durante 5 d, por las vías intranasal u oral, según el grupo de tratamiento. Los animales fueron sacrificados el séptimo día y con los homogenados pulmonares se calculó el título hemaglutinante y la dosis infectiva viral media. El peso inicial y final de cada animal / grupo fue medido en este estudio. Los resultados indicaron que todos los ratones infectados y luego tratados con BLBu no mostraron pérdida de peso corporal. Los animales infectados y tratados con 175 mg/kg de peso de BLBu por la vía intranasal, experimentaron la mayor reducción del título hemaglutinante viral (< 2). La dosis de 175 mg/kg de peso de BLBu que fue suministrada tanto por vía intranasal como oral, disminuyó en más de 2 log₁₀ el título infectivo del virus.

ABSTRACT. *Punica granatum* L. (BLBu) extract was prepared from ripe fruit, which is commonly used in Cuban traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. In our study, female mice (Balb/C strain, 4 weeks old) were organized into four groups, with 20 animals per group. I, II y III groups received a single dose of 25 μ L of 10 DIE_{50} of the Influenza virus A / Sidney / 5 / 97 (H_3N_2) by each nostril. IV group was virus negative standard, which only received the top dosage of BLbu (175 mg/kg of weight). The treatment with BLbu began 24 h after the infection. BLbu was administered in a single-daily dosage (50 μ L) of 50 and 175 mg/kg of weight during 5 d by intranasal or oral route according to the treatment. Animals were put to sleep the seventh day and starting from their lung homogenates it was calculated the hemagglutinant title and the viral infective half dose too, the animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment. The results showed that the mice treated with Blbu did not lose weight. The infected animals and then treated with 175 mg/kg of weight of Blbu for the intranasal route, experienced the biggest reduction in the hemagglutinant title (< 2). The dose of 175 mg/kg of weight of Blbu given so much for intranasal route as for oral route reduced in more than 2 log₁₀ the viral infective title.

INTRODUCCION

La infección producida por los virus influenza daña de forma moderada aproximadamente el 80 % de la población mundial y de forma grave al 10 %, fundamentalmente durante la llamada temporada de gripe que se produce cada año.¹ En Cuba es considerada la cuarta causa de muerte en la población.² El virus se caracteriza por infectar las vías respiratorias altas y bajas, produciendo un síndrome febril y malestar general. La presencia de un genoma segmentado en el virus influenza, le posibilita estar cambiando anualmente la composición antigénica de sus proteínas de superficie, por lo que el sistema inmune de la población queda desprovisto de una respuesta memoria de anticuerpos que puedan hacerle frente a una nueva cepa de este virus.³ Esta ha sido una de las limitantes más frecuentes e importantes que impiden la protección duradera mediante la vacunación contra el virus influenza.

El reciente aviso de la comunidad científica, que alerta que la próxima pandemia probablemente podría originarla el virus influenza, despierta la atención sobre la posible utilidad que podrían tener los antigripales conocidos y en desarrollo, tanto en la prevención como en el tratamiento de la población, ante esta posible amenaza.⁴⁻⁶

La situación actual de los antivirales contra los virus influenza no es alentadora, pues de los antivirales

aprobados por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos: amantadina, rimantadina, ribavirina, zanamivir y oseltamivir,^{7,5,8} todos producen efectos colaterales en mayor o menor cuantía, que alteran de forma adicional el estado general del paciente. Por otra parte, durante la terapia con algunos de ellos emerge rápidamente el fenómeno de la resistencia viral, hecho que limita su uso en la profilaxis.⁹ En Cuba, los frutos de *Punica granatum* L. han sido usados tradicionalmente en el tratamiento de acidosis, disentería, infecciones microbianas, helmintiasis y patologías respiratorias.¹⁰⁻¹² El extracto liofilizado de *Punica granatum* L. (BLBu), ha mostrado actividad antiviral *in vitro*, tanto por acción directa sobre el virus Influenza,¹³ como en los hospederos de embrión de pollo¹⁴ y cultivos de líneas celulares,¹⁵ produciendo en ellos reducciones en más de 2 log₁₀ del título infectivo viral. El análisis fitoquímico del extracto utilizado en este trabajo reveló la presencia de carbohidratos reducidos, mucílagos, glucósidos, fenoles-taninos, flavonoides, antocianidinas y alcaloides,¹⁶ que han sido referidos con diversas acciones farmacológicas, entre las que se destacan las antivirales y antimicrobianas.^{10,13,14} Las determinaciones de los componentes químicos del BLBu se realizaron de acuerdo con el procedimiento desarrollado por el programa Nacional de Plantas Medicinales aprobado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba.¹⁷ Teniendo en cuenta las posibilidades que brindan los compuestos naturales, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antiviral del extracto natural BLBu mediante el empleo del modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C.

MATERIALES Y METODOS

Material de prueba

BLBu es un extracto liofilizado preparado a partir de frutos maduros de *Punica granatum* L.,¹⁸ el cual fue conservado a -20 °C hasta su utilización. Se preparó una disolución madre del liofilizado con agua destilada estéril para la administración de las dosis (50 y 175 mg/kg de peso) a los respectivos grupos de ratones utilizados en el estudio.

Virus

Se utilizó el virus influenza A /Sidney /5/97 (H₃N₂), procedente del cepario del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). Esta cepa fue mantenida mediante pases

sucesivos por la vía alantoidea de embriones de pollo y conservada a -70 °C hasta su utilización.

Embriones de pollo

Se utilizaron huevos embrionados de la raza Leghorn, de 10 a 11 d de incubación, libres de patógenos específicos, suministrados por el Centro Nacional Productor de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se incubaron a 37 °C y a una humedad relativa (del 80 % aproximadamente). Su viabilidad se comprobó diariamente mediante el examen al ovoscopio.

Animales

Ratones hembras de la línea Balb/C (calidad certificada) adquiridos en el CENPALAB, de 15 a 18 g de peso y aproximadamente 4 semanas de edad, se colocaron en cajas (T3) con tapas filtro, que a su vez, fueron colocadas en cabinas de presión negativa (TECNIPLAST). Dichos animales se alimentaron con pienso comercial aprobado para los requerimientos de la especie y tomaron agua potable, ambos a libre consumo. Permanecieron a una temperatura que oscilaba entre 22 y 25 °C, una humedad relativa del 60 %, un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los animales se mantuvieron en cuarentena durante 48 h previas a su uso. La inoculación y la toma de muestras se realizaron en el área protegida del vivario del IPK, mediante el empleo de un gabinete de seguridad clase II. Todos los procedimientos para la manipulación de los ratones, fueron llevados a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del CENPALAB.

Adaptación del virus al tejido pulmonar del ratón

Para adaptar el virus al tejido pulmonar de los ratones, se realizaron varios pases seriados, utilizando la vía intranasal. Se empleó como inóculo inicial la cepa antes referida cuyo título en embriones de pollo fue de 10⁻⁵ DIE₅₀ y para los pases siguientes en el proceso de adaptación, los inóculos se prepararon con los extractos al 10 % de homogenados pulmonares, que fueron cosechados a las 72 h posteriores a la infección. La presencia de virus en los pulmones en cada uno de los pases se siguió mediante la prueba de hemaglutinación.¹⁹ Al final del proceso el virus adaptado fue titulado y conservado estérilmente hasta su uso.

Ensayo de la actividad antiviral del BLBu en ratones

Se designaron cuatro grupos de 20 ratones cada uno para el ensayo por la vía intranasal y otros cuatro grupos de 20 ratones cada uno para la vía oral. Los grupos I, II y III recibieron una dosis única de 25 μL de 10 DIE₅₀ de virus por cada fosa nasal, el grupo IV funcionó como control negativo de virus, pues solo recibió BLBu. La dosificación del BLBu para el tratamiento diario de los diferentes grupos comenzó 24 h después de la infección, administrándole 50 μL de la concentración correspondiente a cada ratón por la vía intranasal, luego de una ligera anestesia con éter. De igual manera, se procedió por la vía oral, excepto que los animales no fueron anestesiados. Por ambas vías de administración el tratamiento con el BLBu, se realizó con una dosis única diariamente durante 5 d.

En todos los casos, se registró el peso de los animales en cada uno de los grupos al comenzar y finalizar el experimento. El peso se determinó en una balanza Sartorius (error < 0,01 g). La presencia de hemaglutinina y los títulos infectivos de las muestras de pulmones de los animales tratados y controles se determinaron mediante las pruebas de hemaglutinación⁵ y el cálculo de la DIE₅₀ según Reed y Muench²⁰ al séptimo día de experimentación. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical de acuerdo con las normas de trabajo vigentes en el vivario del IPK. El procesamiento estadístico de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico TONYSTAT.²¹

RESULTADOS Y DISCUSION

En experimentos previos^{22,23,24} otros autores han demostrado que los ratones infectados con el virus influenza experimentan una pérdida de peso corporal durante el tiempo en que transcurre la infección. Teniendo en cuenta estas evidencias el peso corporal de los ratones es una variable útil e importante para seguir el curso de la infección experimental del virus influenza en estos animales. Se comprobó que los animales que solo recibieron virus (Grupo III) experimentaron una pérdida de peso corporal que resultó evidente al culminar el experimento (Tabla 1). Estos resultados demuestran que los animales manifestaron uno de los síntomas que predominan durante la infección con virus influenza. Los ratones infestados con virus y luego tratados con BLBu (grupos I y II) no

experimentaron pérdida de peso corporal y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales que solo recibieron el BLBu por cualesquiera de las vías de administración utilizadas (Grupo IV). Los estudios toxicológicos realizados al extracto por Vidal y col.¹⁸ en dos líneas de ratones, Balb/C y Albino swiss indicaron que el BLBu no influye en el peso corporal de los animales tratados con dosis hasta cinco veces mayores que las utilizadas en este trabajo. Se puede inferir que el BLBu ejerce un efecto protector sobre los animales infectados, impidiendo la pérdida de peso corporal. Esta inferencia puede ser explicada teniendo en cuenta que el BLbu es una mezcla de diferentes principios naturales activos con un elevado contenido de vitamina C entre otros compuestos.¹⁴ Esta vitamina desempeña un papel relevante en el funcionamiento del sistema inmunológico, pues es responsable de estimular las defensas inespecíficas en estos animales. Lo anterior se traduce en una respuesta protectora frente al virus, más energética y rápida, lo que contribuye quizás a que el peso corporal del animal sea afectado lo menos posible durante el período de enfermedad que provoca el virus en el animal.

Una técnica de gran importancia en la detección de los virus que poseen la glicoproteína hemaglutinina resulta la prueba de hemaglutinación,⁵ puesto que es de fácil ejecución, de elevada reproducibilidad, poco costosa y rápida para la determinación de los resultados. Con el objetivo de comprobar si el antiviral en estudio (BLBu) era capaz de disminuir la cantidad de antígenos hemaglutinantes en los pulmones de los ratones tratados y controles, por las vías intranasal u oral, se realizó la técnica antes mencionada (Tabla 2).

Se pudo observar que cuando el extracto BLBu se administró por la vía intranasal, los macerados preparados con los pulmones de los ratones que tenían menor título hemaglutinante, pertenecían a los grupos I (175 mg/kg de peso corporal) y IV (control negativo de virus y que solo recibió BLBu), sin arrojar diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 2). El resultado anterior indica que la dosis de BLBu administrada a los animales del grupo I logró reducir hasta un valor mínimo la presencia de virus, medido de manera indirecta por la presencia de hemaglutinina, al compararse con el grupo IV. A los animales del grupo IV a pesar de solo recibir BLbu, se les detectaron títulos hemaglutinantes < 2. Este comportamiento quizás se deba a la presencia de hemaglutininas inespecíficas que han sido referidas por otros autores.^{14,19}

Los grupos II y III tratados por la misma vía intranasal (Tabla 2) siguieron en orden ascendente en cuanto a la presencia de hemaglutinina, lo fue revelado por los resultados estadísticos, los cuales arrojaron diferencias significativas entre estos dos grupos y con respecto a los an-

teriores I (175 mg/kg de peso corporal) y IV (control negativo de virus, solo recibió BLBu). El grupo II de ratones recibió menor concentración de BLBu (50 mg/kg de peso corporal) y en las muestras de tejido pulmonar estudiadas, se observó mayor título hemaglutinante viral, con respecto al grupo de animales a los que se les trató con la mayor dosis de BLBu. Estos resultados sugieren que la reducción del título hemaglutinante en las muestras de pulmón está directamente relacionada con la concentración de BLBu administrada a los ratones que previamente fueron inoculados con el virus por la vía intranasal.

Los resultados correspondientes a la administración del antiviral por la vía oral, arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos de experimentación (Tabla 2). Los bajos títulos observados en el grupo IV tratado por esta vía, podrían tener un origen inespecífico como se explicó con anterioridad.

Por las dos vías ensayadas en el estudio del antiviral, el grupo I fue el que tuvo menor cantidad de glicoproteína viral y le siguió en or-

Tabla 2. Resultados de la prueba de hemaglutinación.

Grupo	Vías de administración			
	Intranasal		Oral	
	Título HA (UHA)	Suma de rangos	Título HA (UHA)	Suma de rangos
I	< 2	0,11 ^c	4	0,53 ^c
II	8	0,82 ^b	8	0,82 ^b
III	32	1,44 ^a	32	1,37 ^a
IV	< 2	0,11 ^c	< 2	0,11 ^d

Títulos hemaglutinantes (HA) dados en unidades hemaglutinantes (UHA) de las muestras de pulmones de los ratones controles y tratados con BLBu.

Letras diferentes en la suma de rangos indican significación estadística en la prueba de Duncan con $P < 0,05$.

Tabla 1. Peso inicial, peso final e incremento de peso (promedio) en los animales tratados y controles por las diferentes vías ensayadas.

Grupo	Concentración del virus (25 μ L)	Liofilizado BLBu (mg/kg)	Vía intranasal			Vía oral		
			Pi \pm DS	Pf \pm DS	Ip \pm DS	Pi \pm DS	Pf \pm DS	Ip \pm DS
I	10DIE ₅₀	175	16,2 \pm 0,6	18,0 \pm 0,6	1,8 \pm 0,4 ^a	16,3 \pm 0,4	17,6 \pm 0,4	1,3 \pm 0,6 ^a
II	10DIE ₅₀	50	15,9 \pm 0,5	17,8 \pm 0,7	1,9 \pm 0,7 ^a	16,3 \pm 0,5	17,5 \pm 0,6	1,2 \pm 0,9 ^a
III	10DIE ₅₀	—	16,4 \pm 0,5	15,2 \pm 0,9	-1,2 \pm 1,1 ^b	16,3 \pm 0,4	15,4 \pm 0,7	-0,95 \pm 0,8 ^b
IV	—	175	16,1 \pm 0,3	18,0 \pm 0,5	1,9 \pm 0,6 ^a	16,4 \pm 0,5	17,3 \pm 0,5	1,0 \pm 0,8 ^a

Letras diferentes en el peso promedio indican significación estadística en la prueba de Duncan con $P < 0,05$. Pi Peso inicial promedio. Pf Peso final promedio. Ip Incremento de peso promedio.

den ascendente el grupo II. Es importante señalar que por la ruta de administración oral, específicamente en el grupo I, no se logra reducir el título hemaglutinante hasta la no existencia de diferencias significativas con el grupo IV (control negativo de virus) como ocurrió en el tratamiento por la vía intranasal. Esta diferencia en la respuesta se debió probablemente a que por la vía oral existe un conjunto de barreras que pueden dificultar la disponibilidad del BLBu en el tejido a tratar. Algunas de estas barreras pueden estar constituidas por el efecto de primer paso en el hígado y la acción degradativa que deben ejercer las enzimas digestivas, la microbiota intestinal y la acidez gástrica sobre el extracto natural. En contraste, el BLBu a través de la vía intranasal aparentemente experimenta menos la acción de las barreras naturales allí presentes, con la ventaja de que el extracto penetra al organismo por la misma puerta de entrada del virus y quizás se facilita el contacto entre ambos y la acción antiviral sea más directa. Esto posibilita que el antiviral llegue con mayor rapidez a los sitios de replicación primaria del virus (mucosa nasal), evitando así, que se produzca un aumento importante de la carga viral necesaria para llegar a su órgano diana (pulmones) y que se instaure la infección. De lo anterior, se concluye que la administración del BLBu por la vía intranasal presenta un mejor comportamiento que por la vía oral, si se tienen en cuenta los títulos hemaglutinantes obtenidos.

Numerosos investigadores^{13,15,19,25} consideran de gran valor las reducciones de 2 log₁₀ o más de los títulos infectivos virales, a la hora de evaluar la acción antiviral de un compuesto en embriones de pollo o en animales de laboratorio (Tabla 3). En los grupos I de ratones que recibieron el BLBu por las vías intranasal u oral, se verificaron reducciones en más de 2 log₁₀ del título infectivo, lo que indica que el extracto en estudio ejerció alguna actividad antiviral sobre ellos. Los grupos II de ratones tratados por esas mismas vías con 50 mg/kg de peso corporal de BLBu, no mostraron tal reducción, lo cual indica que la respuesta observada está en función de la concentración del antiviral, por lo que la concentración que resultó efectiva en este experimento fue la de 175 mg/kg de peso corporal.

En los animales del grupo III tratados por ambas rutas, se registra-

ron títulos infectivos elevados que coincidieron con la dosis infectiva media por embrión (DIE₅₀) que recibieron al inicio de la experiencia. En este caso, exhibieron títulos infectivos elevados porque constituyeron los grupos controles positivos de virus en el experimento.

CONCLUSIONES

El extracto liofilizado de *Punica granatum* L. evita la pérdida de peso corporal en ratones Balb/C infectados por el virus influenza A/Sidney/5/97 (H₃N₂) y tratados con el extracto. La mayor eficacia del antiviral en estudio (título hemaglutinante < 2) se registra en el grupo de ratones infectados y tratados con la mayor dosis (175 mg/kg de peso) de BLBu por la vía intranasal, lo que indica que el extracto en estudio posee actividad contra el virus de la gripe en este modelo animal en las condiciones experimentales empleadas.

BIBLIOGRAFIA

1. APHA. Asociación Estadounidense de Salud Pública. Manual para el Control de las Enfermedades Transmisibles. 16a ed. Ed., Abram S Beneson, Publicación Científica No. 564 de la Organización Mundial de la Salud, 68-75, 1997.
2. MINSAP, Dirección Nacional de Estadísticas del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba, 2004.
3. Laver WG, Bischofberger N. and Webster R.G. The origin and control of pandemic influenza. **Perspect. Biol. Med.**, **43**, 173-92, 2000.
4. Snacken R., Kendal A.P., Haaheim L.R. and Woods J.M. The Next Influenza Pandemic: Lesson from Hong Kong. **Emerging Infectious Diseases**, **5**, 1-8, 1999.
5. Osterhaus A.D. and de Jong J.C. The battle against Influenza: antivirals versus vaccine. **Vaccine**, **12**, 568-70, 1999.
6. Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R. and Skalka A.M. Principles of Virology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington D.C, USA, 716-27, 2000.
7. Barreto P.J., González-Piñeira G.J., Rodríguez R.M., y Pino A.P. Medicamentos antivirales. **Acta Médica**, **8**, 109-119, 1998.

8. Editorial PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 27. ed., Bogotá, 1999.
9. Mast E.E, Harmon M.W., and Gravenstein, S. Emergente and posible transmisión de amantadine-resistant virases during nursing home outbreaks of Influenza A (H₃N₂). **American Journal Epidemiol.**, **134**, 988-997, 1991.
10. Vlietinck A.J., and Vanden Bergh D.A. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, **32**, 141-153, 1991.
11. Sydiskis R.J., Owen D., Lohr J.L., Rosler K.H., and Blomster R.N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **35**, 2463-2466, 1991.
12. Taylor R.S., manandhar N.P., Hudson J.B., and Towers G.H. Anti-viral activities of Nepalese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, **52**, 157-163, 1996.
13. Peña B.R., y Martínez E. MT. Inhibición de la hemaglutinación de cepas de influenza A por un extracto liofilizado de granada BLBu. **Revista Cubana de Química**, **XIII**, 395, 2001.
14. Peña B.R. Bllu: un extracto de frutos de *Punica granatum* L. con actividad contra el virus Influenza. Tesis en opción del título de Maestro en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, abril, 1998.
15. Caballero P.O., Peña B.R., Zurcher J., Ortín J. y Martínez T. Actividad inhibitoria de extractos del fruto de *Punica granatum* L. sobre cepas del virus de la gripe. **Revista Cubana de Química**, **XIII**, 106, 2001.
16. Pendás J., Moreira T., Guerra O., Peña B., and Fernández J.A. Water relationship in *Phyllanthus orbicularis* and *Punica granatum* L. antiviral extracts and their influence on stability after freezing and freeze-drying. **Cryletters**, **22**, 5-12, 2001.
17. MINSAP National Program of Medicinal Plants. Ruta Crítica para evaluación de Plantas Medicinales en Cuba. La Habana, 1994.
18. Vidal A., Fallarero A., Peña B.R., Medina M.E., Gra B., Rivera F., Gutierrez and and Vuorela P.M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, **89**, 295-300, 2003.

Tabla 3. Títulos infectivos (DIE₅₀) en las muestras de pulmón de los ratones por cada grupo y vías de tratamiento y los respectivos índices de reducción de la DIE₅₀ en los grupos bajo tratamiento con el BLBu.

Vía de inoculación	Logaritmo negativo de la DIE ₅₀ / Índice de reducción de la DIE ₅₀			
	Grupo I		Grupo II	
	I	II	III	IV
Intranasal	2,74/2,26	3,49/1,51	5,3/0	0/0
Oral	2,64/2,36	4,21/0,79	5,0/0	0/0

19. Burleson F.G., Chambers T.M. and Wiedbrauk D.L. *Virology: A laboratory manual*. Academic Press, Inc. California, USA, 144-45, 1992.
20. Reed L.J. and Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, **27**, 493-497, 1938.
21. Sigarrosa A. Paquete estadístico TONYSTAT, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1985.
22. Kuchler Chr., Kuchler W. and Schulze W. Antiviral effect of methylglyoxal-bis-guanylhydrazine. **Acta Viroológica**, **12**, 441-45, 1968.
23. Johansson B.E., Grajower B. and Kilbourne E.D. Infection-permissive immunization with influenza virus neuraminidase prevents weight loss in infected mice. **Vaccine**, **11**, 1037-1039, 1993.
24. Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Min Jou W. and Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. **Nature Medicine**, **5**, 1157-63, 1999.
25. Mahy B.M. and Kangro H.O. *Virology Methods Manual*. Academic Press Limited, 306-7, 1996.

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba

OFERTAS DOCENTES



El Departamento de Postgrado del Centro Nacional de Investigaciones Científicas atiende las solicitudes docentes específicas que necesite un cliente relacionadas con los temas siguientes:

📖 Tecnologías para la fabricación de equipos médicos de última generación. 📖 Tecnología láser en cirugía. 📖 Equipos médicos para el diagnóstico de enfermedades. 📖 Equipos médicos para el diagnóstico microbiológico. 📖 Aspectos generales sobre la ozonoterapia. Equipos médicos para ozonoterapia. 📖 Equipos para el tratamiento de agua y aguas residuales de las instalaciones hospitalarias y farmacéuticas. 📖 Gestión ambiental. 📖 Control de la calidad en laboratorios de ensayo. 📖 Bioética: un puente sobre educación y diversidad. 📖 Condiciones generales acerca de la metodología en la investigación científica. 📖 La Didáctica y sus componentes: herramienta para la formación de investigadores.

Los cursos pueden negociarse en forma de Seminario-Taller (con una duración promedio de 1 semana). Se incluye en la cuota de inscripción la entrega de información sobre el Seminario-Taller en formato digital y recorridos por centros de investigación y producción relacionados con los temas del curso contratado.

Los idiomas de trabajo pueden ser: Español, Inglés, Francés o Ruso.

El programa contempla visitas opcionales preseleccionadas a lugares turísticos, históricos y económicos de Cuba con un módico costo adicional.

El transporte aéreo, el alojamiento, la alimentación y el transporte interno se contratan a través de una económica oferta para este tipo de estudiantes y depende del destino hacia Cuba y el número de estudiantes.

El pago es en efectivo en el momento de la matrícula en pesos convertibles cubanos (CUC) o su equivalente en dólares norteamericanos. Al profesor o estudiante que organice o venga al frente de un grupo, se le exime de cuota de inscripción.

Al iniciar la solicitud de un curso o su prematrícula es necesario enviar mensaje electrónico con los datos siguientes: Nombre y apellidos, especialidad, institución de trabajo, dirección del lugar de trabajo, código postal, ciudad y país de residencia. Además, teléfonos, fax y correo electrónico.

Para mayor información:

Dr. Pável Díaz González de Mendoza, Director de Capital Humano.
Teléfonos: (53) 7 208 2553; Fax: (53) 7 208 0497. Correo electrónico: pavel.diaz@cnic.edu.cu

Lic. Luis Delgado Pérez, Jefe de Departamento de Relaciones Internacionales.
Teléfono (53) 7 208 5277. Correo electrónico: rrij@cnic.edu.cu

Dra. Gisela M. Cañedo Iglesias, Jefa del Departamento de Docencia.
Teléfono (53) 7 208 5277. Correo electrónico: dpto.postgrado@cnic.edu.cu

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Avenida 25 No.15202 esquina a Calle 158, Playa, Apartados Postales 6412 y 6414, Código Postal 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.