

Ensayo de Primera Ola del Factor de Transferencia (HEBERTRANS)

Lizet Aldana Velazco, Karelia Cosme Díaz, Delia Porras Castellanos, Nelson Merino García,* Carmen Valenzuela Silva, Rubén Amaya Izquierdo, José Suárez Alba, Ariel Vázquez Bonachea, Dania Bacardí Fernández, Lorelys Milá Cáceres y Kosara Sánchez Alvarez.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6162, Código Postal 10600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Email: lizet.aldana@cigb.edu.cu. **Departamento de Anatomía Patológica, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana.

Recibido: 12 de diciembre de 2002. Aceptado: 1ro de octubre de 2003.

Palabras clave: Factor de Transferencia, toxicidad, toxicidad aguda, tolerancia local.
Key words: Transfer Factor, toxicity, acute toxicity, local tolerance.

RESUMEN. El Factor de Transferencia es un agente natural que aumenta la capacidad para combatir las enfermedades y mejorar la calidad de vida, ha sido usado exitosamente para tratar enfermedades virales, parasitarias, neurológicas, micóticas y autoinmunes y también utilizado en pacientes que no responden a prescripciones convencionales o que desarrollan reacciones de toxicidad severas a estas. Este producto obtenido a partir de células sin inducir (por el virus Sendai) constituye una nueva y muy apropiada formulación teniendo en cuenta el método de obtención. La dosis terapéutica en humanos es de 1 mg/mL y su frecuencia de administración está asociada a la patología del paciente. Por su gran importancia para su uso en humanos, se realizó un ensayo toxicológico (toxicología aguda), para determinar la seguridad del producto. Se utilizaron tres dosis superiores a la terapéutica. Se realizaron observaciones clínicas diarias y determinaciones del peso corporal de forma semanal. Transcurrida la fase experimental (14 d), se realizó el sacrificio de los animales, todo lo cual se llevó a cabo cumpliendo las normas éticas, con análisis macroscópicos y microscópicos de órganos relacionados con el sistema hemolinfopoyético y el hígado. Al comparar los resultados de los grupos tratados con el placebo, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal ni se reportaron efectos adversos en los órganos estudiados, lo que permitió concluir que la nueva formulación no resulta tóxica.

ABSTRACT. The Transfer Factor is a natural agent increasing the resistance against the diseases and improving the quality of life, it has been used successfully to treat viral, parasitical, neurological, fungi and autoimmune diseases, being used in patients who do not respond to conventional prescriptions or that develop severe reactions of toxicity. This product was obtained from non induced cells (by the Sendai virus) and constitutes a new very appropriate formulation considering the production method. The therapeutic dose is 1 mg/mL and its administration regime is associated with the patient's pathology. Despite its important use in humans, a toxicology test was made (acute toxicity), in order to assess the safety of this product. Three levels of doses up to the therapeutic one were used. Daily clinical observations and determinations of the gained weight measurements were carried out. After the experimental phase (14 d), animals were put to sleep after ethical requirements, with macroscopic and microscopic evaluation of organs related to the hemolinfopoyetic system and liver. Comparing the results of the rats treated with control groups, neither significant differences in the gained weight, nor adverse effects in the studied organs were observed; concluding that the new formulation is not toxic.

INTRODUCCION

El Factor de Transferencia (FT) es un agente natural que puede aumentar la capacidad para combatir las enfermedades y mejorar la calidad de vida para muchas personas. Se encuentra en el calostro, la sangre y otras fuentes, y es un medio natural para fortalecer el sistema inmunológico contra las enfermedades.¹ Los FT de origen murino, bovino o humano son pequeñas moléculas de aproximadamente 3 500 a 6 000 Da^{2,3} y muy estables a bajas temperaturas,⁴ la actividad biológica se mantiene aún después de muchos años a temperatura entre -20 y -70 °C.⁵

La transferencia adoptiva de la inmunidad mediada por células de forma antígeno-específica en humanos fue demostrada por primera vez por Lawrence en 1949, lo que abrió una nueva vía de investigación que trajo consigo un incremento en la comprensión de los mecanismos básicos del sistema inmune y el desarrollo de novedosas formas de inmunoterapia. Lawrence demostró la transferencia de leucocitos viables provenientes de un donante normal con reactividad cutánea ante la tuberculina a otro individuo que inicialmente fuera sensible ante esta. La misma respuesta era también obtenida al administrar el extracto soluble de leucocitos provenientes de 20 mL de sangre, todo lo cual trajo consigo que al factor responsable de este fenómeno se le llamara *factor de transferencia*. El término se reser-

vó para aquellos componentes del extracto dializable de leucocitos (EDL) capaces de transferir respuestas inmunológicas de un donante a un receptor⁶ dependientes de la acción de los linfocitos T. Esta fracción contiene una multitud de Factores de Transferencia correspondiente a la suma de las experiencias inmunes de los sujetos individuales, entre los que se han identificado la timosina, prostaglandinas, hipoxantina y nicotinamida.

Muchos estudios del efecto de las enzimas sobre la actividad biológica antígeno-específica del FT indican que los factores contienen bases ribonucleotídicas enlazadas a péptidos pequeños, la destrucción de estos enlaces implica la desaparición de la actividad biológica. Cada FT contiene al menos ocho aminoácidos.^{8,9} En relación con su peso molecular y su composición aminoacídica, los FT no provocan reacción alérgica.¹⁰

El EDL, con actividad de FT, puede ser obtenido de linfocitos de sangre periférica, nódulos linfáticos, bazo y placenta de varias especies. Es capaz de cruzar la barrera interespecies sin efectos adversos o pérdida de potencia. Puede ser preparado por linfocitos obtenidos por venipuntura, leucoforesis o linfoforesis y a partir de líneas celulares de un donante con una inmunidad celular elevada en respuesta a un antígeno determinado o sensibilizando una línea celular con una preparación de especificidad conocida y de placenta (Sánchez K., comunicación personal, 2001).

El tratamiento con EDL con actividad de FT es indicado para un amplio espectro de enfermedades del sistema inmune celular. La dosis terapéutica es 1 mg/mL, en un volumen total de 1 mL, estando la frecuencia de administración asociada a la patología del paciente. Puede ser utilizado en pacientes con candidiasis mucocutánea crónica o en ciertas enfermedades refractarias a otras terapias, aunque generalmente es utilizado en pacientes que no responden a prescripciones convencionales o que desarrollan reacciones de toxicidad severas a estas. De forma general, el FT ha sido usado exitosamente para tratar enfermedades virales, parasitarias, neurológicas, micóticas y autoinmunes.¹¹

Se cuenta con formulaciones obtenidas, generalmente a partir de la inducción de virus o de las fuentes naturales antes mencionadas, las que han proporcionado buenos re-

sultados en su uso preclínico y clínico antes las diferentes patologías en las que se probado,^{5,12-18} debido a su acción sobre el sistema inmunológico.⁶ Entre las muchas formulaciones que se encuentran establecidas en el mercado internacional, se encuentran, la 4 Life Transfer Factor y la Transfer Factor Plus.

En cuanto a las vías de administración utilizadas, este producto es usualmente aplicado por inyección intramuscular o subcutánea, aunque la vía oral parece ser igualmente efectiva.¹⁹ Si se desea obtener una acción más rápida, se puede utilizar la vía intravenosa. Se ha observado en algunos casos, dolor en el sitio de una inyección intramuscular o subcutánea durante 10 a 20 min posteriores a ella, aunque no existen reportes acerca de reacciones de hipersensibilidad o de efectos adversos al cabo del tiempo.⁵

La formulación probada en este ensayo fue obtenida por una vía no inducida a través del virus Sendai. El objetivo de este estudio fue evaluar los posibles efectos tóxicos del Factor de Transferencia sin inducir tras la administración de dosis elevadas de este producto.

MATERIALES Y METODOS

Sustancia de ensayo

El Factor de Transferencia fue obtenido bajo condiciones de Buenas Prácticas de Producción (BPP) y suministrado por la Dirección de Producción del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, luego de realizados estudios en los que se comprobó su esterilidad, apirogenicidad, características organolépticas, pH y actividad biológica, según las especificaciones de calidad establecidas.²⁰ El ingrediente farmacéutico activo del FT está constituido por el EDL obtenido de leucocitos humanos previamente empleados para la producción de Interferón. Una Unidad es equivalente al dializado obtenido de 5-10⁸ leucocitos/mL. La formulación contiene además, cloruro de sodio: 9,49 mg, hidrógenofosfato de sodio: 1,09 mg, dihidrógenofosfato de potasio: 0,26 mg, cloruro de potasio: 0,20 mg y dextrana de bajo peso molecular: 10 mg.

Animales

Se empleó un lote de 60 ratas albinas, Sprague Dawley (30 de cada sexo), jóvenes adultas hembras y machos, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con

certificado de salud que avala su calidad.²¹ La edad de los animales empleados fue de 37 d nacidos como media. Se recibieron con un peso promedio entre 101 y 125 g y se mantuvieron en instalaciones de barreas. Al culminar el período de adaptación de 7 d,²²⁻²⁸ se pesaron para seleccionar los animales y se tomaron solo aquellos cuyos pesos se encontraban dentro de los extremos mínimos y máximo del $\pm 20\%$ del peso corporal promedio y habían sido clasificados como clínicamente sanos.^{22,24-27} Posteriormente, fueron distribuidos en cuatro grupos de trabajo (10 por sexo), formados al azar, según programa Aleator. Fueron alojados en grupos de tres y dos para cada grupo y sexo y se mantuvieron en ambiente controlado de temperatura y humedad relativa, con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.²²⁻²⁴ Se les suministró dieta comercial EMO 1001 (ALYco®, CENPALAB) y agua potable acidulada y ozonizada, *ad libitum*.

Dosificación, vía y zona de administración

Teniendo en cuenta la dosis terapéutica de 1 mg/mL y el peso promedio en humanos,²⁹ la dosis calculada para el lote fue de 0,24 mg/mL, o sea 2,4 μ L. Se establecieron tres niveles de dosis de 50, 90 y 180 veces la terapéutica las que fueron administradas a los animales de los grupos II, III y IV respectivamente. En los grupos III y IV (hembras y machos), en los que el volumen a aplicar sobrepasó el máximo a administrar²⁴ en cada sitio (Tabla 1), el volumen total fue dividido en cantidades equitativas para cada extremidad del animal.

Teniendo en cuenta lo recomendado para la terapia de humanos, la vía de administración fue la intramuscular.³⁰ La sustancia de ensayo fue administrada en el cuádriceps femoral de la extremidad posterior derecha. Se realizó una sola administración el día 1 del ensayo con jeringuillas de 1 mL graduadas en 0,01 mL con agujas de 26 G X 1/2 pulgadas, estériles.

Observaciones realizadas

A partir del día de aplicación se comenzaron a realizar las observaciones clínicas diarias a cada animal, en las cuales se evaluó el comportamiento, aspecto de las mucosas y el sitio de administración entre otros exámenes. Se realizó además palpación abdominal en busca de tumores u otro signo que pudiera ser atribuido a la sustancia en estudio y

se exploró la aparición de alteraciones en los sistemas respiratorios, circulatorio, nervioso central y autónomo.²² El período de observación post-administración fue de 14 d en busca de signos de toxicidad retardada.²²

El peso corporal se determinó semanalmente. El consumo de agua y alimento fue medido de forma cuantitativa.²²

Anatomía patológica

El estudio anatómo-patológico comenzó el día 15 del ensayo para cada grupo experimental. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, previo trata-

miento anestésico. Posteriormente, se realizó la necropsia, así como la observación macroscópica.^{31,32} Se disectaron y tomaron muestras de los órganos relacionados con el sistema hemolinfopoyético: bazo, ganglios mesentéricos y timo, así como hígado y tejido muscular del sitio de administración, las cuales se colocaron en formalina neutra al 10 %, para su posterior procesamiento histológico.^{31,32}

Análisis estadístico

La variable usada para el tratamiento estadístico fue el peso corporal de los animales en los días 0, 7 y

14. Para cada grupo experimental se conformó una tabla que recoge las medias de tendencia central y la dispersión, así como los valores máximos, mínimos y el intervalo de confianza de 95 % para la media.

En cada sexo, para el análisis del peso corporal se verificaron los supuestos de normalidad (pruebas de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). En dependencia de su cumplimiento, se realizaron análisis de varianza paramétrico (ANOVA) o no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis), corregidos por el error de Bonferroni. En cada grupo se realizaron análisis pareados entre los pesos en cada tiempo con respecto al inicio, mediante la prueba de Wilcoxon.

En el caso de los machos, al verificar el cumplimiento de la hipótesis de simetría compuesta, fue necesario realizar una prueba univariada con grados de libertad ajustados para la correcta interpretación de los resultados.

La variable *hallazgos microscópicos de las muestras de tejido* no fue analizada, ya que el estudio histopatológico no arrojó anomalías.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad

No se reportaron muertes por lo que sobrevivió al ensayo el 100 % de los animales.

Reportes clínicos

En las observaciones clínicas realizadas diariamente y durante los primeros 20 min posteriores a la administración, no se evidenciaron signos de toxicidad. No se observaron cambios en la piel y en el pelo, en los ojos y membranas mucosas, los animales mantuvieron adecuada actividad somatomotora y el comportamiento y respuesta ante diferentes estímulos fue el normal para la especie.^{26,27,33}

Peso corporal

En cuanto al peso corporal, se observó un aumento normal durante el estudio, en ambos sexos. Al realizar el análisis pareado, se comprobó la existencia de diferencias significativas en el tiempo, por lo que al analizar la ganancia en peso entre los días 0 a 7 y 7 a 14 y entre los pesos inicial y final, el balance general arrojó un incremento del peso corporal en todos los animales. Al graficar las medias de peso corporal de los grupos y sexos, se observó una pendiente ascendente para el período evaluado (Figuras 1 y 2).

Tabla 1. Dosificación y volumen de administración ajustados a la media de peso corporal.

| Grupo | Tratamiento | Dosificación (mg/mL) | | Volumen (μL) | |
|-------|---------------|----------------------|--------|--------------|--------|
| | | Hembras | Machos | Hembras | Machos |
| I | Placebo | 0 | 0 | 432* | 567* |
| II | Dosis baja | 0,12 | 0,15 | 120 | 159 |
| III | Dosis media | 0,21 | 0,27 | 216* | 279* |
| IV | Dosis elevada | 0,43 | 0,56 | 432* | 567* |

* Se administraron volúmenes equitativos en cada extremidad.

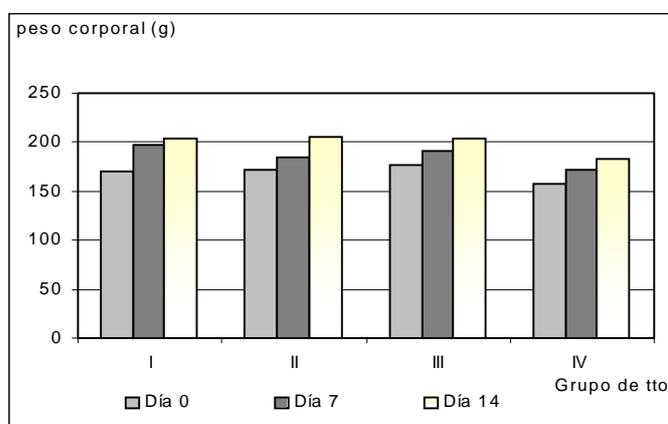


Fig. 1. Comportamiento en el tiempo del peso corporal (PC) de las hembras.

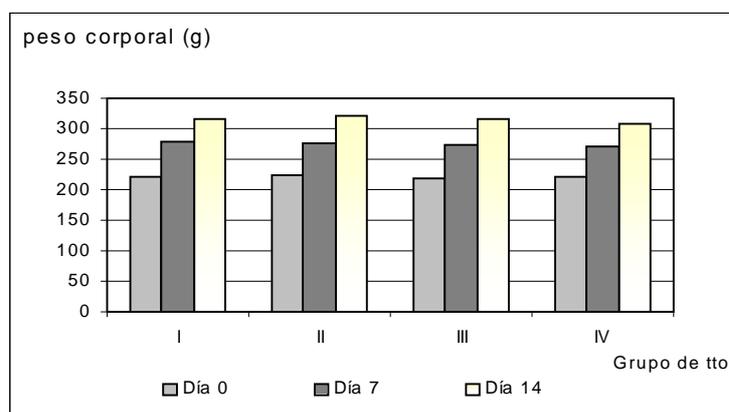


Fig. 2. Comportamiento en el tiempo del peso corporal (PC) de los machos.

Resultó evidente que los animales mantuvieron un incremento progresivo de peso durante el período de experimentación, lo cual es un índice que habla a favor de la sustancia en estudio teniendo en cuenta que no existe una evidente influencia de ella sobre la ganancia en peso corporal de los animales, lo que indirectamente evidencia la ausencia de toxicidad de la sustancia en estudio. Uno de los signos clínicos primarios en esta especie ante el estrés o enfermedad es la disminución del peso corporal, por lo que el efecto contrario se considera signo de bienestar.^{20,21} En el caso de los animales a los que se administró el FT sin inducir, incluso en aquellos que recibieron dosis tan elevadas como 180 veces la terapéutica, el incremento del peso corporal coincide con lo reportado en la curva de crecimiento para animales sanos por IFFA-CREDO, lo que indica que la sustancia

de ensayo no causó alteraciones en el metabolismo del animal.³⁴

Consumo de alimento y agua

Las observaciones cualitativas relacionadas con el agua y el alimento ingeridos durante el ensayo por los animales, no demostraron afectaciones en ellos, al encontrarse dentro del intervalo para la especie,^{24,34} por lo que la administración del FT sin inducir, a grados dosis no produce efecto negativo en ambos.

Anatomía patológica

No se observaron alteraciones en los órganos y tejidos inspeccionados en el momento de la necropsia.

Microscópicamente, tampoco se observaron alteraciones en hígado y timo. En bazo y ganglios mesentéricos se observaron cambios morfológicos de estimulación antigénica, incluido el grupo tratado con placebo

(Figuras 1 y 2), aunque dicha estimulación fue más evidente en los animales tratados con la sustancia de ensayo (Figuras 3 y 4). Este hallazgo se caracteriza por la formación de folículos secundarios, presencia de centros germinales activos y una expansión hiperplásica del paracórtex de los ganglios mesentéricos. Al estar presente en todos los animales indica que estuvieron expuestos a estímulos antigénicos inespecíficos y que en el caso de los tratados con el FT, pudiera haber sido incrementada.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que, tras la administración única de dosis hasta 180 veces la dosis terapéutica, el factor de transferencia sin inducir no pone de manifiesto signos de toxicidad sistémica ni desarrolla efectos adversos en el sitio de administración.

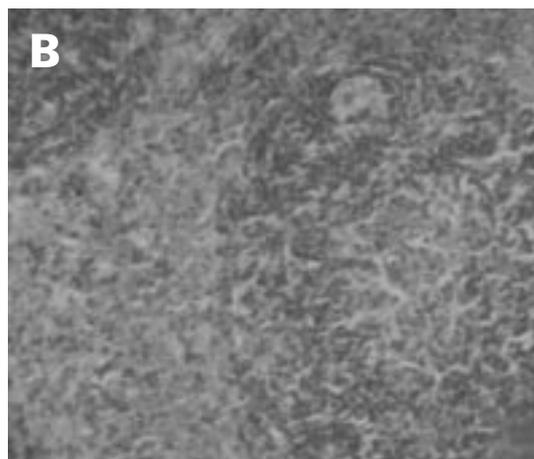
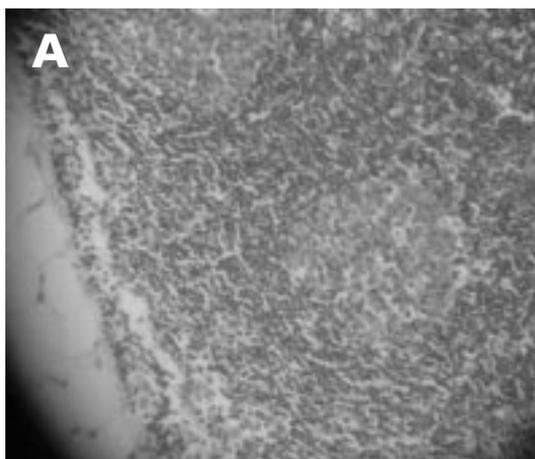


Fig. 3. Grupo tratado con placebo. Se muestra el ganglio mesentérico (A) y bazo con centros germinativos y figuras en apoptosis (B).

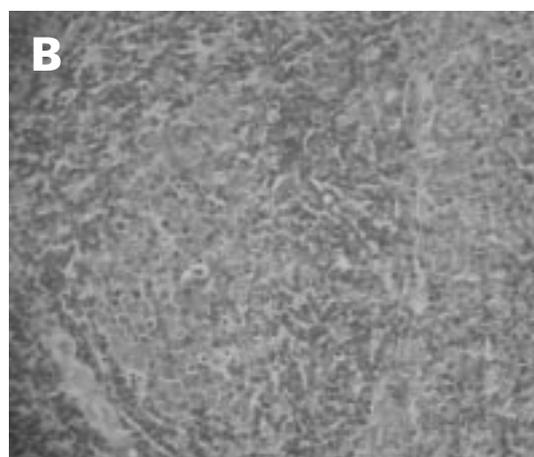
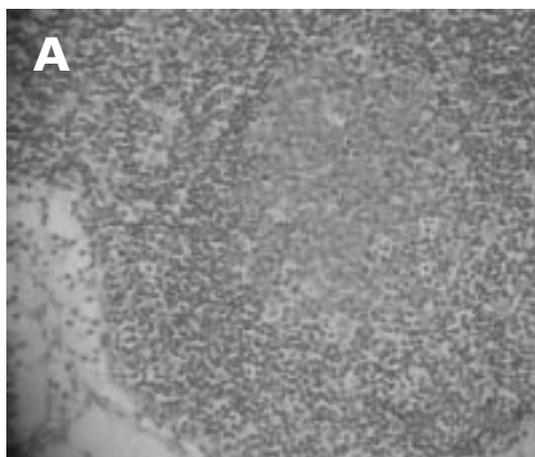


Fig. 4. Grupo dosis elevada (tratado con 180 veces la dosis terapéutica). Se muestra el ganglio mesentérico (A) y bazo con centros germinativos y figuras en apoptosis (B).

BIBLIOGRAFIA

1. Hennen W. J. Informe sobre el Factor de Transferencia. Woodlang Publishing. 1998.
2. Qi H.Y., Wan Z.F., Su C.Z. Chemical characterization of the purified component of specific transfer factor in the leukocyte dialysates from HSV-1 immunized goats. **Acta Virol.**, **36**, 239-44, 1992.
3. Rozzo S.J., Kirkpatrick C.H. Purification of transfer factors. **Mol. Immunol.**, **29**, 167-82, 1992.
4. Karhumaki E., Marnela K.M., Krohn K.. Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leukocytes and porcine spleen dialysate. **Int. J. Biochem.**, **20**, 1067-72, 1988.
5. Kirkpatrick C.H. Activities and characteristics of Transfer Factors. **Biotherapy**, **9**, 13-16, 1996.
6. Kirkpatrick C.H. Transfer Factor: Identification of conserved sequences in Transfer Factor molecules. **Mol. Med.**, **6**, 332-341, 2000.
7. Smogorzewska E. Transfer of delayed type hypersensitivity in guinea pigs. *Probl. Med. Wieku Rozwoj.*, **16**, 167-188, 1990.
8. Lawrence H.S. Borkowsky W. Transfer Factor-Current status and future prospects. **Biotherapy**, **9**, 1-5, 1996.
9. Pizza G., Viza G. Transfer Factor in the Era of AIDS. **Biotherapy**, **9**, 1996.
10. Lawrence H.S. The cellular Transfer of cutaneously, hypersensitivity to tuberculin in man. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **7a**, 516. 1949.
11. Bemhisel-Broadbent J., Yolken R.H., Sampson H.A. Allergenicity of orally administered immunoglobulin preparations in food allergic children. **Pediatrics**, **87**, 208-214, 1991.
12. Liubuchenko T.A., Holeva O.H., Kholodna L.S., Smirnov V.V., Vershyhora A.I. The biological activity of the transfer factor induced by bacterial antigens. **Mikrobiol. Z.**, **59**, 83-100, 1997.
13. Estrada-Parra S., et al. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. **Int. J. Immunopharmacol.**, **20**, 521-35, 1998.
14. Valdés Sánchez A.F., Martín Rodríguez O.L., Lastra Alfonso G. Treatment of extrinsic bronchial asthma with transfer factor. **Rev. Alerg.**, México, **40**, 124-31, 1993.
15. Salazar Villa R.M., Mejía Ortega. Use of transfer factor in allergic bronchial asthma. **Rev. Alerg.**, **40**, 42-5, 1993.
16. Navarro Cruz D and col. Transference factor in moderate and severe atopic dermatitis. **Rev. Alerg.**, México, **43**, 116-23, 1996.
17. Pizza G., Viza D., De Vinci C., Palareti A., Cuzzocrea D., Fornarola V., Baricordi R. Orally administered HSV-specific transfer factor (TF) prevents genital or labial herpes relapses. **Biotherapy**, **9**, 67-72, 1996.
18. Sosa M., Flores G. et al. Comparative treatment between thalidomide and transfer factor in severe atopic dermatitis. **Rev. Alerg.**, México, **48**, 56-64, 2001.
19. Kirkpatrick C.H., Hamad A.R. Morton L.C. Murine. Transfer Factor dose response relationships and routes of administration. **Immunol.**, **164**, 203-206, 1995.
20. Rodríguez A. Análisis de calidad del Factor de Transferencia sin inducir. Informe Final. Departamento de Aseguramiento de la Calidad. Dirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana. Informe No. 0556, 2001.
21. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Certificado de salud, No. 0197, División de Roedores Gnotobióticos, Ciudad de La Habana, 2001.
22. OECD Guidelines for testing of chemicals. Section 4: Health Effects, 1993.
23. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Committee on IRAC. May 20. Washington D.C., 1996.
24. Canadian Council on Animal Care. Guide for the care and use of experimental animals. Vol. 1. Second edition. Edited by E.D. Olfert; B.M. Cross and A.A. McWilliam, 1993.
25. EMEA/ ICH. CPMP/ICH/302/95. Note for Guidance on Preclinical safety evaluation of Biotechnology derived pharmaceuticals, 1997.
26. EMEA/ ICH. CPMP/SWP/465/95. Note for guidance on preclinical Pharmacological and toxicological testing of vaccines, 1998.
27. National Research Council. Animal Alternatives, Welfare and Ethics, Edited by L.F.M. van Zutphen and M. Balls. Developments in Animal and Veterinary Sciences, **27**, 1997.
28. Cosme Díaz K. et al. Programa para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Edición 01, 1998.
29. NHCS 2000, Normas internacionales. UNICEF-Ministerio de Salud Pública de Cuba. Encuesta por conglomerados de indicadores múltiples. (MICS) .
30. Victor Lucas, Jr. Animal Use in Toxicity Evaluation, Anesthetic Toxicity. Edited by Susan A. Rice and Kevin J. Fish. Raven Press Ltd., New York. 9-33, 1994.
31. Clinical Pathology Methods for Toxicology Studies in: Principles and Methods of Toxicology, Third Edition, edited by A. Wallace Hayes. Raven Press, Ltd., New York, 1994.
32. Greaves P, Faccini J.M. Rat Histopathology. Elsevier Science Publishers B.V., 1984.
33. Fox J.G., Cohen B.J. and Loew F.M. Ed. Laboratory Animal Medicine. Chpt. 4. Biology and Diseases of rats. ACLAM Series. Academic Press Inc. Orlando, Florida, 1984.
34. IFFA CREDO Animax de Laboratoire, 1997.

RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

RELACIONES FITOGENETICAS DEL GENERO *Pinus* (*diploxylon* + *haploxylon*) Y VARIACION GENETICA EN *Pinus tropicalis*

Universidad de Pinar del Río "Hermanos Saíz Montes de Oca".

Los resultados de la investigación permitieron elaborar un nuevo esquema de Clasificación Taxonómica Género *Pinus* (subgéneros: *diploxylon* y *haploxylon*) a partir de 110 especies de pinos muestreadas en toda su área de distribución, basado en marcadores moleculares de ADN y morfológicos tradicionales.

Este trabajo, representa el primero del país con la utilización de técnicas de secuenciación del ADN e integración a otras disciplinas como la geología, evolución y la silvicultura. Con sus resultados se identifica a *Pinus tropicalis* (pino hembra) como la especie más ancestral de Norteamérica y endémica de la región occidental de Cuba, cuya evolución difiere completamente de las demás especies americanas. La definición de *Pinus maestrensis* como otra nueva especie cubana, formada mediante la hibridación del *Pinus occidentalis* y *Pinus cubensis*. Además, la infalible demostración acerca de la imposibilidad de la formación de híbridos entre el *P. tropicalis* y *P. caribea*, una de las grandes inquietudes entre los forestales y genetistas mejoradores cubanos.