

INDUSTRIA MEDICOFARMACEUTICA. CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO  
DE MEDICAMENTOS. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS

## EVALUACION GENOTOXICA DE UN EXTRACTO ACUOSO DE *Aloe vera* L

Lic. Alberto Ramos Ruiz,<sup>1</sup> Lic. Aymee Edreira Armenteros,<sup>2</sup> Lic. Aida Villaescusa González,<sup>3</sup>  
Lic. Angel Vizoso Parra<sup>3</sup> y Lic. María Julia Martínez<sup>4</sup>.

### RESUMEN

Se realizó la evaluación mutagénica de un extracto acuoso liofilizado de hojas de *Aloe vera* L., para la cual se emplearon tres ensayos a corto plazo: inducción de mutaciones puntuales (supresores) en el *locus* methG1 de *Aspergillus nidulans*, segregación mitótica en un diploide heterocigótico de *Aspergillus nidulans* y el test de micronúcleos en médula ósea de ratón. Para los ensayos *in vitro* se evaluaron concentraciones entre 0,05 y 5 mg de extracto de aloe/mL en medio de cultivo (mutaciones puntuales) y de 0,04 a 1 mg/mL (segregación mitótica); se empleó el método de incorporación en placa. No se detectaron aumentos significativos para la frecuencia de mutantes supresores en el primer ensayo, ni de sectores segregantes homocigóticos en el segundo, que son indicadores de genotoxicidad para estas pruebas. En el ensayo *in vivo* se emplearon ratones de la línea isogénica suizo, a los que se hicieron dos administraciones del extracto por vía intragástrica, en dosis de 0,5, 1,0 y 2,0 g/kg/día, con sacrificio 24 horas después de la última aplicación. En ningún caso se detectó efecto citotóxico sobre la proliferación celular en la médula ósea, ni aumentos significativos en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados 2(mPCE), indicador de mutagenicidad para este ensayo.

**Palabras clave:** *Aloe vera*; Genotoxicidad; *Aspergillus nidulans*; Test de micronúcleos; *In vitro*.

### INTRODUCCION

El *Aloe vera* L. (figura), conocido comúnmente en Cuba como sábila, es una planta empleada extensamente en la medicina tradicional. Se le atribuyen numerosos efectos, tales como antiulceroso, antiinflamatorio, hepatoprotector, cicatrizante y analgésico,<sup>1</sup> muchos de los cuales han sido

comprobados en modelos experimentales y ensayos clínicos.<sup>2,3</sup>

En cuanto a estudios toxicológicos, la información disponible indica una buena tolerancia en ensayos de toxicidad aguda, con valores de LD50 de 3,6 g/kg por vía subcutánea<sup>3</sup> y ausencia de letalidad hasta 12 g/kg (Tillán J., comunicación personal). No se han encontrado reportes

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado. CIDEM.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora. CIDEM.

<sup>3</sup> Licenciado(a) en Biología. Investigador(a) Agregado(a). CIDEM.

<sup>4</sup> Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. Laboratorio Central de Farmacología. Facultad de Medicina "Dr. Salvador Allende". ISCMH.

experimentales sobre la toxicidad genética en esta planta.

Con el fin de obtener información al respecto, se evaluó el comportamiento de un extracto acuoso de sábila en tres ensayos de mutagenicidad. De estos, dos fueron pruebas *in vitro* que emplean el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans*: inducción de mutaciones génicas (supresores del locus methG1) y segregación mitótica en un diploide heterocigótico para mutaciones recesivas del color de los conidios, que detecta procesos de *crossing-over* mitótico, aneuploidía y clastogénesis. Un tercer ensayo, el *test* de micronúcleos en médula ósea de ratón, permite evaluar la inducción de daño cromosómico *in vivo*.

La primera de estas pruebas, se basa en la ocurrencia de supresión extragénica en una cepa auxotrófica para metionina, *Aspergillus nidulans* FGSC 219 (biA1; methG1). Las colonias mutantes, supresores del marcador methG1, se identifican porque han recuperado la capacidad de crecer en ausencia de metionina y en su mayoría exhiben rasgos morfológicos distintivos como pobre conidiación y pigmentación oscura o conidiación densa y bordes hialinos.<sup>4</sup>



Figura. Aloe vera L (sábila).

Por otra parte, en cepas diploides de *Aspergillus nidulans* convenientemente marcadas se hace posible con relativa facilidad poner de manifiesto la ocurrencia de segregación somática, ocasionada por *crossing-over* mitótico y/o malasegregación de cromosomas (como procesos primarios o a consecuencia de mutaciones previas con efectos semi-dominantes sobre la viabilidad). Estas cepas son heterocigóticas para los marcadores recesivos de color de los conidios y al ocurrir alguno de los fenómenos antes mencionados, aparecen en las colonias expuestas sectores, bandas o puntos de conidiación de color diferente al resto.<sup>5</sup>

El ensayo de inducción de micronúcleos en la médula ósea de ratón es una prueba *in vivo* ampliamente validada y permite detectar agentes que causan tanto ruptura cromosómica (y cromatídica) como pérdida de cromosomas completos (al afectar, por ejemplo, la función del huso mitótico). En ambos casos, la migración y distribución de parte del material genético se ven alterados durante la anafase y telofase, lo cual conduce a la formación de núcleos secundarios o “micronúcleos”. Estos pueden identificarse fácilmente en eritrocitos jóvenes de la médula ósea.<sup>6</sup>

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

Las hojas se recolectaron en la Estación Experimental “Dr. Juan Tomás Roig” durante los meses de agosto y noviembre de 1991. Un ejemplar de la planta se encuentra depositado en el herbario de la estación experimental, identificado con el registro 4591. Estas se lavaron con agua corriente y se almacenaron de nueve a quince días en frío (2 a 8 °C), protegidas de la luz. Transcurrido ese tiempo se molieron, y la mezcla resultante (macerado) se reflujoó 30 min, enfrió y filtró al vacío. El filtrado, (1,19 % de sólidos totales) se liofilizó y posteriormente se almacenó, protegido de la luz en una desecadora con silicagel, hasta su uso.

### Ensayo de supresores del locus methG1 en *Aspergillus nidulans*

Para la prueba de inducción de mutaciones génicas (supresores del locus methG1) se empleó la cepa haploide FGSC 219 (biA1; methG1). Se preparó una suspensión de conidios en solución salina con 0,01 % de Tween 80. En erlenmeyers, con 250 mL de medio mínimo (MM) agarizado, mantenido a 50 °C, se inocularon  $2,8 \times 10^7$  conidios y se adicionaron distintos volúmenes del extracto de

sábila, reconstituido con agua destilada, en un rango de concentraciones de 0,05 a 5 mg/mL. El contenido de cada erlenmeyer se distribuyó en 14 placas, que se incubaron a 37 °C durante cinco días, transcurrido ese tiempo se contaron las colonias crecidas (mutantes supresores).

### Ensayo de segregación somática en *Aspergillus nidulans*

Se empleó la cepa diploide *Aspergillus nidulans* D-307, obtenida a partir de los haploides FGSC A593(a) y FGSC A594(b). Se siguió un protocolo experimental de incorporación del extracto de sábila al medio de cultivo (medio completo, MC) agarizado. En placas así dispuestas, se siembran en punto conidios de la cepa y se incuban de 6 a 10 días a 37 °C.<sup>8</sup> En experimentos previos se determinó que la concentración máxima que se debe ensayar era de 1 mg/mL de MC. Para los valores superiores, aunque no se observó toxicidad cuantitativa (como reducción del crecimiento lineal de la colonia), si se presentaron alteraciones en la morfología y conidiación que afectaban la visualización de los sectores segregantes. Podría pensarse en efectos citotóxicos circunscritos a los eventos de diferenciación celular que conducen a la formación de esporas asexuales (conidios) en el ciclo vegetativo del hongo. De hecho el crecimiento y desarrollo micelial es un proceso complejo, susceptible de ser interferido en sus múltiples etapas. Al respecto, se ha citado el caso de varios fungicidas como polioxin D, cicloheximida, carboxin, triarimol y nistatin, que afectan el crecimiento y no causan daño genético, pues su blanco de acción no se relaciona directa ni indirectamente con los mecanismos hereditarios.<sup>9</sup>

Podría pensarse en efectos citotóxicos circunscritos a los procesos de diferenciación celular que conducen a la formación de esporas asexuales (conidios) en el ciclo vegetativo del hongo. De hecho el crecimiento y desarrollo micelial es un proceso complejo, susceptible de ser interferido en sus múltiples etapas.

Al respecto, se ha citado el caso de varios fungicidas como polioxin D, cicloheximida, carboxin, triarimol y nistatín, que afectan el crecimiento y no causan daño genético, pues su blanco de acción no se relaciona directa ni indirectamente con los mecanismos hereditarios.<sup>9</sup>

La genotoxicidad se evalúa en términos de la frecuencia de sectores segregantes de color de los conidios (marcadores recesivos en homocigosis) observada para cada concentración ensayada.<sup>8</sup>

Las cepas haploides empleadas en ambos ensayos procedieron del Fungal Genetics Stock Center (FGSC), Atlanta, EE.UU. Los medios de cultivo mínimo y completo fueron los descritos para este ensayo.<sup>10</sup>

### Ensayo de micronúcleos

La prueba se realizó en ratones albinos de la línea no isogénica suiza, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Previo a la experiencia, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana en el bioterio de la Facultad de Medicina “Dr. Salvador Allende” del ISCMH. Recibieron dieta (pienso peletizado, “ratonina”) y agua *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperaturas convencionales.

Se conformaron cinco grupos de ocho animales (cuatro de cada sexo): control negativo, control positivo y tres tratamientos. En este último caso se administró extracto liofilizado de sábila disuelto en agua destilada y hervida. La dosis máxima se seleccionó teniendo en cuenta la ausencia de toxicidad del extracto acuoso por vía oral (hasta 12 g/kg de pc no causan letalidad en ratones de la misma línea y procedencia; Tillán J., comunicación personal).

Para el *test* de micronúcleos se sugiere que en el caso de sustancias no tóxicas y libremente solubles, la dosis máxima sea de 2 g/kg/día en tratamientos menores de 14 días.<sup>11</sup> Luego se aplicaron tres dosis de 0,5, 1,0 y 2,0 g/kg de pc/día respectivamente. El extracto se aplicó por vía intragástrica, en un volumen de 1 mL/100 g de pc. Se hicieron dos aplicaciones con un intervalo de 24 horas entre sí. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última aplicación por dislocación cervical.<sup>12</sup> Se prepararon extensiones de médula ósea<sup>13</sup> y una vez fijadas con etanol, se tiñeron con Giemsa al 5 % durante 20 minutos.

Se contaron al menos 1 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal, además, los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes por cada 250 PCE para estimar la relación PCE/NCE, indicador de citotoxicidad. Los micronúcleos se identificaron de acuerdo con los criterios establecidos.<sup>14</sup>

## RESULTADOS

### Ensayos con *Aspergillus nidulans*

En la tabla 1 se muestran los resultados para la prueba de inducción de supresores de metionina. El extracto no resultó tóxico en ninguna de las concen-

traciones ensayadas; incluso en los valores de 5 mg/mL se observa un aumento en la viabilidad de los conidios. No hubo incremento significativo en los valores de frecuencia de mutación observados respecto al control negativo, en cambio, hubo una disminución de 5 mg/mL, en la cual influye el aumento experimentado en la sobrevivencia.

En la [tabla 2](#) aparecen los resultados correspondientes al ensayo de segregación mitótica, tampoco en este caso se aprecia aumento en la frecuencia de segregantes; para la concentración más alta (1 mg/mL) se observó una disminución del 50 % en esta frecuencia.

### Ensayo de micronúcleos

Durante el tratamiento ningún animal resultó muerto y no se observaron síntomas de toxicidad, excepto una ligera pérdida de peso con la dosis más

alta. No hubo depresión en la relación entre PCE y NCE, indicadora de citotoxicidad. El análisis estadístico del porcentaje de PCE micronucleados encontrado tampoco arrojó diferencias en cuanto a sexo ( $p = 0,166$ ), dosis ( $p = 0,491$ ), ni la interacción sexo x dosis ( $p = 0,217$ ) ([tabla 3](#)).

## DISCUSION

### Ensayos con *Aspergillus nidulans*

Como se señaló anteriormente, en la prueba de inducción de supresores de metionina, el extracto de sábila no resultó tóxico ni genotóxico, incluso hubo un aumento en la viabilidad de los conidios, que podría atribuirse a la presencia de algún agente citoprotector o un antagonista del inhibidor de la germinación en *Aspergillus nidulans*.<sup>15</sup>

Tabla 1. Inducción de supresores del locus *methG1* en presencia del extracto de sábila en la cepa *Aspergillus nidulans* FGSC 219

Concentración (mg/mL)	Conidios germinados	Sobrevivencia (%)	Colonias supresoras	Frecuencia de supresores ( $\times 10^{-6}$ )
0,00	7,33	100,0	59	8,1
0,05	6,39	87,0	54	8,5
0,50	7,69	105,0	55	7,2
5,00	13,15	179,0	54	4,1*
Dietil sulfato <sup>1</sup> 4 mM	2,02	28,0	345	170,7*

<sup>1</sup> Control positivo.

Nota: Resultados promedio de dos experimentos.

\*  $p < 0,01$  (test "t" de Student).

Tabla 2. Inducción de segregación mitótica en la cepa diploide *Aspergillus nidulans* D-30 en presencia del extracto de sábila

Concentración (mg/mL)	Colonias analizadas	Sectores segregantes	Frecuencia de sectores por colonia
0,00	67	88	1,31
0,04	73	6	1,15
0,10	59	69	1,17
0,40	56	56	1,00
0,80	43	43	0,72*
1,00	32	23	6,07*
Acetaminocina D <sup>1</sup> 10 mM	71	431	6,07*

<sup>1</sup> Control positivo.

Nota: Resultados promedio de tres experimentos. Para el análisis estadístico se aplicó la transformación  $\sqrt{(x+0,5)}$  a los sectores encontrados en cada colonia, previo a un ANOVA simple.

\*  $p < 0,01$  (test "t" de Dunnett).

Tabla 3. Resultados del ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón para el extracto de sábila

Tratamiento (g/kg/día)	PCE/NCE <sup>1</sup> ± 177	DE	PCE <sup>2</sup>	mPCE <sup>3</sup>	% mPCE ±177	DE
0 <sup>4</sup>	1,13 ±177	0,22	8 000	17	0,26 ±177	0,22
0,5	1,49 ±177	0,17	8 000	28	0,35 ±177	0,08
1,0	1,24 ±177	0,25	8 000	22	0,27 ±177	0,19
2,0	1,22 ±177	0,09	8 000	19	0,24 ±177	0,12
Ciclofosfamida <sup>5</sup>						
0,02	1,84 ±177	0,87	8 000	53	0,66 ±177	0,27*

Nota: Resultados promedio para ocho animales/grupo experimental (se agrupan los dos sexos). Para el análisis estadístico se aplicó la transformación antes de realizar un ANOVA de dos vías.

<sup>1</sup> Indicador de citotoxicidad medular.

<sup>2</sup> PCE totales analizados.

<sup>3</sup> PCE micronucleados.

<sup>4</sup> Control negativo, agua destilada.

<sup>5</sup> Control positivo.

\* p < 0,01 (test de Dunnett).

En cuanto al ensayo de segregación mitótica, merece destacarse la disminución del 50 % observada en la frecuencia de sectores segregantes para la concentración más alta (1 mg/ml), lo cual podría indicar cierta capacidad antimutagénica por parte del extracto. Tomados en conjunto estos resultados indican ausencia de genotoxicidad *in vitro*.

Entre los principales componentes químicos de las hojas de sábila se encuentran derivados de la 1,8 dihidroxiantraquinona. Estos se han aislado en su forma libre (aloe-emodina, ácido crisofámico) y como C-glucósidos y ramnósidos, entre los cuales se destacan la barbaloina e isobarbaloina y los aloinósidos A y B, que rinden aloe-emodina-antrona como aglicona al hidrolizarse.<sup>3</sup>

Se conoce que tanto el antraceno como la antraquinona son mutagénicos en la prueba de Ames.<sup>16,17</sup> El antraceno resultó positivo al ensayarlo en la cepa de *Salmonella typhimurium* TA 100, con activación metabólica exógena (S9) y la antraquinona lo fue en las cepas TA 98 y TA 100, con y sin S9. No obstante, un derivado trihidroxilado del antraceno (1,8,9 trihidroxiantraceno) estructuralmente cercano al aloe-emodina-antrona (1,8 dihidroxi 3 hidroximetil 9(10 H) antraquinona) resultó negativo en cuatro cepas estándar.<sup>18</sup> Podría pensarse que la introducción de grupos hidroxilo atenúan la genotoxicidad en este caso.

Por lo pronto, aunque no se conocen reportes para el aloe-emodina, se ha demostrado que la emodina, otra antraquinona de origen natural presente en *Rhamnus frangula* L. y *Rhamnus purshiana* DC (1,3,8 trihidroxi 6 metil antraquinona), es antimutagénica frente al 1-nitropireno, la cual inhibe la formación de aductos de DNA por parte de este conocido mutágeno.<sup>19</sup>

## Ensayo de micronúcleos

Los resultados obtenidos *in vitro* se corroboraron en el ensayo *in vivo* en médula ósea de ratón, donde tampoco se pudo observar efecto citotóxico ni mutagénico sobre los eritroblastos. Estos resultados están en concordancia con la ausencia de toxicidad sistémica reportada para el mismo extracto en ensayos de toxicidad aguda y subcrónica (Tillán J., comunicación personal).

En las condiciones de ensayo anteriormente descritas, el extracto acuoso de hojas de *Aloe vera* L. (sábila) no resultó genotóxico en ningún caso. Estos resultados contribuyen a respaldar la inocuidad de las preparaciones a partir de sábila destinadas para la terapéutica humana.

## SUMMARY

**A mutagenic assessment of a lyophilized aqueous extract from leaves of *Aloe vera* L. was made; using three short-term assays, induction of punctual mutation (suppressor) in locus methG1 of *Aspergillus nidulans*, mitotic release in an heterozygote of *Aspergillus nidulans* and test of micronuclei in spinal cord of mouse. For *in vitro* assays, authors assessed concentrations between 0,05 and 5 mg of extract from Aloe/mL in culture medium (punctual mutations), and of 0,04 to 1 mg/mL (mitotic release), using method of addition in plate. Significant increases weren't found in frequency of mutant suppressors in first assay neither homozygotic releasing sectors in second assay, suggesting genotoxicity for these tests. For *in vivo* assay, we used Swiss mice of isogenic lineage, which were given two administrations from the extract by intragastric route, in doses of 0,5; 1,0; and 2,0 g/kg of body weight/day, and were sacrificed 24 hours after**

last application. No toxic effect was found on cellular proliferation in bone, and no significant increases were observed in the frequency of micronucleated polychromatic red cells 2 (mPRE), considered as an indicator of mutagenicity to this assay.

**Key words:** *Aloe vera*; Genotoxicity; *Aspergillus nidulans*; Micronuclei test; In vitro.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1974.
2. Grindlay G, Reynolds T. The aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacol* 1986;16:117-51.
3. González-Quevedo M. Compendio de Investigaciones sobre el Aloe barbadensis Miller (Sábila) cultivado en Cuba (I). La Habana: Imprenta de la Dirección Política Principal de las FAR, 1990.
4. Scott BR, Dorn GL, Käfer E, Stafford R. *Aspergillus nidulans*: systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation II. Haploid assay systems and overall response of all systems. *Mutation Res* 1982;98:49-94.
5. Käfer E, Scott BR, Kappas A. Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res* 1986;167:9-34.
6. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18:277-91.
7. Käfer E. Tests which distinguish induced crossing-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus* treated with chloral hydrate and y rays. *Mutation Res* 1986;164:145-66.
8. Torre RA de la, Rúa R de la, Hernández G et al. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res* 1989;222:337-41.
9. Georgopoulos SG, Kappas A, Hastie, AC. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology* 1976;66:217-20.
10. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans*: an organism for detecting a range of genetic damage. En: Serres Fj De, Hollaender A eds. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1982:447-79.
11. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT et al. In vivo erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Res* 1994;312:293-304.
12. Garriott ML, Piper CE, Kokkino AJ. A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assay. *J Appl Toxicol* 1988;8:141-4.
13. Schmid, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A ed. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1976:31-53.
14. The Collaborative Study Group for the micronucleus test. Sex difference in the micronucleus test. *Mutation Res* 1986;172:151-163.
15. Scott BR, Alderson T, Papworth DG. The effect of radiation in *Aspergillus conidium* I. Radiation sensitivity and a "germination" inhibitor. *Rad Botany* 1972;12:45-50.
16. Mortelmans K, Haworth S, Lawlor T, Speck W, Tainer B, Zeiger E. Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 255 chemicals. *Environ Mutagen* 1986;8(Suppl 7):1-119.
17. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1988;11(Suppl 12):1-157.
18. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1992;19(Suppl 21):2-141.
19. Su HY, Cherng SH, Chen CC, Lee H. Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutation Res* 1995;329:205-12.
20. Lovell DP, Albanese R, Clare G, et al. Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays. En: Kirkland DJ ed. Statistical evaluation of mutagenicity test data. Cambridge: Cambridge University, 1989:184-230.

Lic. Alberto Ramos Ruiz. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Avenida 26 No. 1605, Nuevo Vedado, Ciudad de La Habana, CP: 10600, Cuba.