

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. CIDEM

DERIVADOS ANTRAQUINÓNICOS DEL *ALOE VERA* L. TAMIZAJE GENOTÓXICO

Lic. Ángel Vizoso Parra¹ Lic. Arilia García López,² Lic. Alberto Ramos Ruiz,³ Lic. Janet Piloto Ferrer⁴ y
Lic. Reinaldo Rivero Martínez⁵

Resumen

Se presentan los resultados obtenidos al tamizar el posible efecto mutagénico de un extracto de derivados antraquinónicos del *Aloe vera* L. en 3 sistemas de ensayo a corto plazo, 2 *in vitro* empleando el ensayo de Ames y la prueba de segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 y otro *in vitro* utilizando el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de Ames se evaluaron concentraciones hasta 5 mg/placa para las cepas TA-1535, TA-1537, TA-98 y TA-100. En el ensayo de segregación mitótica se probaron concentraciones hasta 0,730 mg de sólidos totales/mL de medio completo. Para el ensayo de inducción de micronúcleos se ensayaron un rango de dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal del roedor. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de derivados antraquinónicos del *Aloe vera* L. fue genotóxico en el ensayo de Ames en la cepa TA-1537 con activación metabólica; no presentó efecto citotóxico ni genotóxico en el ensayo de segregación mitótica. En la prueba *in vivo* no indujo respuesta genotóxica significativa en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos ni daño medular.

Descriptores DeCS: ALOE; ANTRAQUINONAS; ASPERGILLUS NIDULANS; MEDULA OSEA; TESTS DE MUTAGENICIDAD; TESTS DE MICRONUCLEOS; RATONES; IN VITRO.

Summary

Results obtained are based on sifting through of possible mutagenic effect of and extract from anthraquinone derivatives of *Aloe vera* L. In three short-term trial systems, two of them were *in vitro* using Ames' trial and mitotic segregation test in D-30 *Aspergillus nidulans* fungus, and another *in vitro* too, using micronuclei induction trial in bone marrow of mouse. In Ames' trial concentrations up to 5 mg/plate for TA-1535, TA-1537, TA-98 and TA-100 strains, were assessed. In mitotic segregation, concentrations up to 0,730 mg of total solids/mL of complete culture medium. For micronuclei induction trial, a dose rank of 500, 1 000, and 2 000 mg/kg of body weight of rodent was analysed. Results obtained show that extract anthraquinone derivatives of *Aloe vera* L. was genotoxic in Ames' trial in TA-1537 strain with metabolic activation hasn't neither the cytotoxic nor genotoxic effect in mytotic segregation trial. In *in vitro* test, there wasn't a significant genotoxic response in frequency of micronuclei in polychromatic red cells and medullary damage.

Subject headings: ALOE; ANTHRAQUINONES; ASPERGILLUS NIDULANS; BONE MARROW; MUTAGENICITY TESTS; MICRONUCLEUS TESTS; MICE; IN VITRO.

Las hojas de *Aloe vera* L. (sábila) perteneciente a la familia *Liliaceae* son ampliamente utilizadas en la elaboración de preparados farmacéuticos y cosméticos. Se emplea en la cura de enfermedades de la piel, daños por irradiación y como antiviral, tratamiento de úlceras del estómago y del duodeno, asma bronquial, etcétera.^{1,2}

En esta planta están presentes compuestos fenólicos clasificados por 2 grandes grupos, cromonas (aloesina) y antraquinonas (barbaloina, isobarbaloina y la aloemodina), los cuales se encuentran libres o en forma de glicósidos.³⁻⁵ En investigaciones con antraquinonas naturales y compuestos afines se han comprobado sus efectos sobre diferentes virus

¹ Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar.

² Licenciada en Microbiología.

³ Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

⁴ Licenciada en Biología.

⁵ Licenciado en Farmacia.

(herpes simple tipo 1 y 2, varicela-zoster, influenza, HIV-1). También se le ha demostrado actividad antibacteriana y antitumoral. Existen reportes relacionados con la capacidad mutagénica de estos compuestos y como promotores de tumores.⁵⁻¹²

Para corroborar su empleo como fitofármaco se llevó a cabo un estudio genotóxico empleando 3 sistemas de ensayo a corto plazo: 2 *in vitro*, el ensayo de Ames y el ensayo de segregación mitótica con el hongo diploide de *Aspergillus nidulans* D-30 y un ensayo *in vivo*, la prueba de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, todos para detectar daños en el genoma celular, ya sea a nivel puntual o a nivel cromosómico.

Métodos

MATERIAL VEGETAL

El material vegetal provino de la Estación Experimental "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena, La Habana. El extracto hidroalcohólico de derivados antraquinónicos con un menstruo etanólico al 50 % se obtuvo en el laboratorio de Productos Naturales del CIDEM.¹³ La composición físico-química del extracto es la siguiente: etanol, 39,95 %; sólidos totales, 2,46 %; derivados antraquinónicos libres, 2,56 %; derivados antraquinónicos totales, 27,06 %; pH, 4,93-5,50; densidad óptica, 0,9903; índice de refracción, 1,3560.

ENSAYO DE AMES

Se utilizó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, recomendada internacionalmente para este ensayo: TA-1535, TA-1537, TA-98, TA-100, enviadas por el Dr. B.N. Ames (Universidad de California en Berkeley, EUA). Se empleó el método de incorporación en placa para evaluar el extracto hidroalcohólico de derivados antraquinónicos en concentraciones de 50 a 5 000 mg/placa de sólidos totales. Se probaron 5 concentraciones, sembrándose 3 placas por cada concentración en un experimento único.¹⁴ El ensayo se realizó con y sin activación metabólica exógena (fracción pos-mitocondrial de hígado de rata, S9) a una concentración final de 4 %. Las placas se incubaron a 37 °C y se contabilizaron las colonias revertantes por placa a las 48 h. Los datos fueron evaluados estadísticamente por medio del programa SALANAL, versión 1.0 (ILS, Research Triangle Park, NC, EUA).

ENSAYO DE SEGREGACIÓN MITÓTICA

Se empleó la cepa *Aspergillus nidulans* D-30,¹⁵ obtenida de los haploides A 593(a) y A594(b) procedentes del Fungal Genetic Stock Center (FGSC), en Atlanta, USA. El

medio de cultivo empleado fue medio completo (MC).¹⁶ Se siguió un protocolo de ensayo de exposición en medio de cultivo agarizado donde se siembran los conidios en punto al centro de las placas y se incuban de 6 a 10 d a 37 °C. En ensayos preliminares se determinó que la concentración máxima a evaluar era de 0,738 mg de sólidos totales/mL de MC. A valores superiores se presentan alteraciones morfológicas y de conidiación que impiden poder observar los sectores segregantes coloreados. Se probaron 6 concentraciones del extracto y el experimento se repitió 3 veces. La citotoxicidad cuantitativa se evaluó a las 72 h de siembra con incubación a 37 °C. Ésta se expresa como el por ciento de reducción en el diámetro de la colonia respecto al control negativo (solvente). La genotoxicidad se evaluó en términos de la frecuencia de sectores segregantes coloreados de los conidios (FSC) marcadores recesivos en homocigosis observada para cada concentración ensayada.¹⁷

El análisis estadístico se llevó a cabo normalizando los valores de la FSC mediante la transformación $\sqrt{(0,5+x)}$. Posteriormente se aplicó un Anova de una vía empleando el paquete estadístico Microsta. Se consideraron genotóxicas aquellas concentraciones que incrementan la FSC el doble o más respecto al control negativo, que sean estadísticamente significativas y dependientes de la concentración.

ENSAYO DE MICRÓNÚCLEOS

El extracto hidroalcohólico se evaporó a presión reducida para eliminar el etanol y el sólido resultante se resuspendió en etanol al 40 %, a una concentración de 200 mg/mL en el momento de la administración a los animales. Se establecieron 6 grupos experimentales: 3 dosis (2 000, 1 000 y 500 mg/kg de peso corporal, pc), control negativo (etanol al 40 %), control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg, pc) y un control espontáneo. Cada grupo contó con 10 animales: 5 machos y 5 hembras. Se emplearon ratones Suizos de 5 semanas de nacidos con un peso promedio de aproximadamente 20 g, provenientes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Éstos se aclimataron durante una semana en el bioterio de la Fac. de Medicina "Dr. Salvador Allende". Se alimentaron con pienso pelletizado (Ratonina, CENPALAB) y agua sin restricción. El extracto se aplicó por vía oral a razón de 10 mL/kg pc, en dosis separadas por 24 h y se procedió al sacrificio 24 h después de la última aplicación. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de médula ósea se obtuvieron según Schmid.¹⁸ Las láminas se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire durante 24 h. Finalmente se tiñeron con Giemsa al 5 % (v/v) en agua corriente durante aproximadamente 20 min. Se contaron 2 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes en 250 PCE para estimar el daño citotóxico (IT=PCE//NCE).

Para el tratamiento estadístico de los datos, se normalizaron los valores PCE/NCE y el % MNPCE (PCE micronucleados) para cada animal empleando la transformación

$\sqrt{(x+1)}$. Después se procedió a realizar un análisis de varianza de 2 vías considerando sexo, dosis e interacción de ambos. La existencia de una posible relación dosis-efecto se estimó por el estadígrafo para tendencias en proporciones lineales (prueba de *Cochran-Armitage*¹⁹. Para que el producto sea genotóxico debe observarse incrementos significativos en la frecuencia de PCE micronucleados y que los mismos tengan una relación dosis-respuesta.

Resultados

La tabla 1 resume los resultados del ensayo de *Ames*. Como puede apreciarse hay un incremento significativo a concentraciones de 500 y 1 500 µg/placa con la cepa TA 1537 con activación metabólica exógena, cepa que detecta corrimiento del marco de lectura.

Los resultados obtenidos en el ensayo de segregación mitótica aparecen en la tabla 2. Como puede observarse no se obtuvieron diferencias significativas para ningún tratamiento como lo demuestra el Anova de una vía ($p = 0,174$) en un intervalo de concentración en donde la toxicidad cuantitativa no es apreciable. En el análisis de regresión lineal tampoco se observó relación concentración-efecto entre las concentraciones y la FSC. $p = 0,104$; $r = 0,663$; $FSC = 1,684-0,802$.

En el ensayo de inducción de micronúcleos la tabla 3 muestra que la relación PCE/NCE indicadora de citotoxicidad medular, no mostró diferencias significativas ni para sexo ($p = 0,913$) ni dosis ($p = 0,884$). El valor del % MNPCE no presentó tampoco diferencias significativas respecto al control negativo ni para sexo ($p = 0,217$) y dosis ($p = 0,401$). La regresión *Cochran-Armitage* tampoco resultó significativa ni para machos ($p = 0,545$) ni hembras ($p = 0,625$).

TABLA 1. Resultados del ensayo de Ames frente a un extracto hidroalcohólico de derivados antraquinónicos

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± D.S			
	TA-98		TA-100	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
0a	22,00 ± 2,65	24,00 ± 6,43	125,33 ± 14,19	107,33 ± 11,68
50	18,67 ± 1,15	25,67 ± 2,31	104,67 ± 7,07	103,33 ± 4,04
150	21,00 ± 1,73	21,33 ± 4,16	113,00 ± 0,72	128,33 ± 7,04
500	19,67 ± 0,58	21,00 ± 0,00	94,67 ± 14,98	97,33 ± 5,86
1500	22,00 ± 2,65	22,33 ± 4,03	90,00 ± 13,23	100,00 ± 4,04
5000	22,00 ± 3,46	26,00 ± 3,46	90,33 ± 4,73	102,00 ± 12,12
Control positivo b	844,00 ± 122,49**	2001,00 ± 368,00**	604,00 ± 17,44**	1696,00 ± 347,24**

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± D.S			
	TA- 1535		TA- 1537	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
0a	14,00 ± 1,00	20,67 ± 4,16	8,00 ± 2,00	13,00 ± 3,67
50	16,00 ± 4,58	20,33 ± 2,08	8,33 ± 2,31	13,00 ± 5,29
150	17,00 ± 6,56	18,67 ± 1,53	9,67 ± 2,08	18,00 ± 0,00
500	18,67 ± 5,77	21,00 ± 7,00	8,33 ± 0,58	23,67 ± 8,50*
1500	13,67 ± 3,06	19,00 ± 6,08	9,67 ± 1,53	29,67 ± 1,53**
5000	12,33 ± 2,89	17,00 ± 3,00	13,67 ± 6,11	19,67 ± 8,36
Control positivo b	369,67 ± 47,51**	249,67 ± 43,82**	751,33 ± 43,56**	655,00 ± 303,94**

a Control negativo: Dimetilsulfóxido (DMS).

b Controles positivos: TA-1535 (-S9), ázida de sodio, 1,5 µg/placa; (+S9), ciclofosfamida, 500 µg/placa.

TA-1537 (-S9), 9-aminoantraceno, 100 µg/placa; (+S9), 2-aminofluoreno, 100 µg/placa

TA-98 (-S9), ácido picrolónico, 100 µg/placa; (+S9), 2-aminofluoreno, 100 µg/placa.

TA-100 (-S9), ázida de sodio, 1,5 µg/placa; (+S9), benzo(a)pireno, 10 µg/placa.

ANOVA $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$

TABLA 2. Resultados de la segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans D-30* frente al extracto hidroalcohólico de derivados antraquinónicos

Concentración mg/mL. Derivados antracénicos	Colonias (1 T %)	Toxicidad ^a	Genotoxicidad			
			Colonias	Sectores Segregantes	FSC	ISMI ^b
Etanol 1,2 % ^c	12	-	45	79	1,75	-
0,025	12	1,83	45	86	1,91	1,09
0,052	12	1,83	45	73	1,62	0,92
0,123	12	0,26	45	76	1,68	0,96
0,246	12	0,26	45	44	0,97	0,55
0,492	12	0,00	44	54	1,23	0,70
0,738	12	-4,45	44	54	1,28	0,73
Metilmetano ^d sulfonato 2,40 mM	12	34,09**	45	34**	7,42**	4,24**
Espontáneo	12	-3,75	45	49	1,38	0,78

^a Reducción del diámetro de las colonias a las 72 h de incubación respecto al control negativo; ^b Índice de segregación mitótica; ^c Control negativo; ^d Control positivo; ANOVA
**p<0,01.

TABLA 3. Ensayo de micronúcleos en ratones tratados con derivados antraquinónicos

Dosis (mg/Kg/día)	Sexo a	PCE/NCE (media ± DS)	MNPCE/ 1000 PCE (media ± DS) b
Etanol al 40 % c	M	1,76 ± 0,12	0,80 ± 0,08
	F	1,66 ± 0,14	1,10 ± 0,15
500	M	1,67 ± 0,06	1,00 ± 0,09
	F	1,67 ± 0,13	0,90 ± 0,09
1000	M	1,68 ± 0,05	0,90 ± 0,05
	F	1,70 ± 0,04	1,10 ± 0,13
2000	M	1,64 ± 0,06	0,90 ± 0,13
	F	1,72 ± 0,04	0,90 ± 0,08
CP 20 d	M	0,67 ± 0,07**	20,50 ± 0,70**
	F	0,65 ± 0,04**	23,80 ± 1,10**
Espontáneos	M	1,65 ± 0,06	1,10 ± 0,08
	F	1,69 ± 0,03	1,60 ± 0,20

a M, machos; F, hembras. positivo

b PCE micronucleados.

c Control negativo.

d Ciclofosfamida, control positivo.

ANOVA; ** p < 0,01 (*t-Student*).

Cochran-Armitage, p= 0,58 (M)

Cochran-Armitage, p= 0,80 (F)

Discusión

Como puede observarse el extracto hidroalcohólico de derivados antraquinónicos induce efecto mutagénico en el sistema de *Ames* con la cepa TA-1537. Los resultados coinciden con lo reportado por *Brusick* y *Mengs* en donde estos autores señalan que algunos derivados antraquinónicos del

antraceno encontrados en algunas plantas (*rheum*, *rhamnus*, *senna* y familias del *Aloe*, etc) particularmente 1-hidroxi y 1-8-hidroxi-antraquinona, inducen mutagenicidad en sistemas bacterianos.²⁰ *Brown* y *Dietrich* en 1979 reportaron que el aloe-emodin es mutagénico en *Salmonella typhimurium* TA-1537 en ausencia de la fracción microsomal S9.²¹ En este caso la mutagenicidad en este sistema *in vitro* se observó en presencia de S9. Sin embargo, se reportan trabajos del potencial antimutagénico del antraceno *in vitro* y *ex-vivo* frente a aminas heterocíclicas relacionado con la inactivación de la familia de las enzimas CYP1, responsable de la capacidad mutagénica y carcinogénica de determinados promutágenos.²² Esta mutagenicidad no se observa en el ensayo de segregación mitótica, posiblemente porque el sistema no sea tan sensible a estos compuestos; por otra parte en el ensayo *in vivo* el efecto genotóxico se pierde debido a múltiples factores fármacos y toxicocinéticos como son: pérdida de la absorción del producto, incapacidad de que los metabolitos reactantes puedan alcanzar el ADN de las células dianas y una rápida detoxificación.

El extracto de derivados antraquinónicos resultó:

- Genotóxico en el sistema de ensayo de *Ames* (*Salmonella* microsomas).
- No tener actividad mutagénica en el ensayo de segregación mitótica.
- No presentar daño genético en el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos.

Referencias bibliográficas

1. Larianova M, Quevedo MG, Coral A, Fuecle V. Estudio comparativo de las hojas y extractos de Aloe arborescens y Aloe barbadensis. Parte 1. Actividad cicatrizante y compuestos antraquinónicos. Rev Cubana Farm 1989;23:270-7.
2. Vanden B. Plant products as potentials antiviral agent. Bull Inst Pasteur 1986;84:101-5.
3. Adamski R, Kodym A. Examinations of content of chemical substances in the preparation "Biestinna as well in level of plants Aloe arborescens Mill. Part 1. antracompounds. Horna Polinica 1974;20:26-31.
4. Stepanova OS. Sobre estudios químicos y actividad biológica del extracto acuoso de Aloe 1. Fisiologic Activ. Veshesta 1977;3:290-307.
5. Abdurjmanova YJ. Nuevas fuentes para la obtención de los preparados de Aloe. Farmatsia 1978;2:40-2.
6. Sydiski RJ, Owen DG, Lohr L, Rosler HA, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:2463-6.
7. Schinazi RF, Chu CK, Babu JR, Oswald BJ, Saalman V, Cannon DL, et al. Anthraquinones as new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. Antiviral Res 1990;13:265-72.
8. Cudin J, Blumauerova M, Steinerova N, Mateju J, Zalabak J. Biological activity of hydroxyanthraquinones and their glucosides toward microorganisms. Folia Microbiol 1976;21:54-7.
9. Barnad DL, Huffman JH, Morris JL, Wood SG, Hughes BG, Sidwell RW. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. Antiviral Res 1992;17:63-77.
10. Structure activity relationship among mycotoxins. Chem Biol Interact 1989;71:105-46.

11. Westendorf J, Marquardt H, Poginsky B, Domimak M, Schmidt J, Marguard H. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutat Res* 1990;240:1-12.
12. Wölfle D, Schmutte C, Westerdof J, Marguardt H. Hydroxyanthraquinones as tumor promotor enhancement of malignant transformation of C-BH mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. *Cancer Res* 1990;50:6540-4.
13. Martínez RR, Leyes ER, Castillo RM, Fernández JA, Barrio G, Sanabria ML. Obtención y caracterización preliminar de un extracto de antracenderivados con actividad antiviral a partir del Aloe vera L. *Rev Cubana Farm* (en prensa).
14. Gatehouse D, Howarth G, Cebula L. Recommendations for the performance of the bacterial mutation assay. *Mutat Res* 1994;312:217-33.
15. Käfer E. Test which distinguish induced crossing-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus nidulans* with chloral hydrate and γ -rays. *Mutat Res* 1986;164:145-66.
16. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans*-an organism for detecting a range of genetic damage. En: De Serres FO, Hollaender A, eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York. Plenum, 1982:447-79.
17. Torre RA de la, Rúa B de la, Hernández G. Genotoxic effect of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1986;222:337-41.
18. Smid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollander A, ed. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York: Plenum, 1976:31-53.
19. Lovell DP, Albanese R, Clare G, Richold M, Savage JR, Andersen D, et al. Statistical analysis in vivo cytogenetic assays. En: Kirland DJ, ed. *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge: University Press, 1989:184-230.
20. Brusick D, Mungs U. Assessment of the genotoxic risk from laxative Senna products. *Environ Mol Mutat* 1997;29:1-9.
21. Brown JP, Dietrich PS. Mutagenicity of anthraquinone and benzathrone derivatives in Salmonella/microsome test: Activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts or rat cecal bacterial. *Mutat Res* 1979;66:9-24.
22. Bu-Abbas A, Joannides C, Walker R. Evaluation of the antimutagenic potential of anthracen in vitro and ex-vivo studies. *Mutat Res* 1994;309:101-07.

Recibido: 24 de marzo del 2000. Aprobado: 12 de septiembre del 2000.

Lic. *Angel Vizoso Parra*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 entre Cerro y Boyeros. Plaza. Ciudad de La Habana. Cuba. CP: 10600. Teléfono: (537) 81-0818, 81-0830. Fax: (537) 33556. e-mail: cidem@infomed.sld.cu