

Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

ESTUDIO GENOTÓXICO *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EXTRACTO FLUIDO DE *CASSIA GRANDIS* L. Y EL GEL DE *ALOE VERA* L.

Lic. Ángel Vizoso Parra,¹ Lic. Alberto Ramos Ruiz,² Lic. Arilia García López,³ Lic. Janet Piloto Ferrer,⁴ y Lic. Vania Pavón González⁵

Resumen

Con el objetivo de conocer la posible actividad mutagénica del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L., que puedan representar algún efecto adverso para su uso en la fitoterapia, se llevó a cabo un estudio toxicogenético empleando 2 sistemas de ensayo a corto plazo uno *in vitro* y otro *in vivo*; el modelo *Aspergillus nidulans* D-30 que detecta daño primario al ADN y el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón el cual determina daño clastogénico y aneugénico. En el ensayo *in vitro* con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (segregación mitótica) se evaluaron concentraciones del extracto fluido de *Cassia grandis* L., desde 0,067 a 1,675 mg de sólidos totales/mL y para el gel de *Aloe vera* L., concentraciones de 0,09 a 1,00 mg de sólidos totales/mL. En la prueba *in vivo* de inducción de micronúcleos se ensayaron para la *Cassia grandis* L. y para el gel de *Aloe vera* L., dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal (pc). En ambas baterías de ensayos genotóxicos ninguno de los 2 fitofármacos mostraron ni daño celular ni actividad genotóxica.

Descriptores DeCs: PLANTAS MEDICINALES; EXTRACTOS VEGETALES/genética; EXTRACTOS VEGETALES/toxicidad; IN VITRO; ASPERGILLUS NIDULANS; RATONES; MEDICINA HERBARIA; ALOE/genética; ALOE/toxicidad; TEST DE MUTAGENICIDAD; TESTS DE MICRONUCLEUS.

Summary

In order to know the possible mutagenic activity of the fluid extract of *Cassia grandis* L. and of *Aloe vera* L. gel that may cause some adverse effect on being used in phytotherapy, a toxicogenetic study was conducted by using 2 systems of short-term tests, one *in vivo* and the another *in vitro*: the *Aspergillus nidulans* D-30 model that detects primary DNA damage and the micronucleus induction test in mouse bone marrow, which determines clastogenic and aneugenic damage. Concentrations of fluid extract of *Cassia grandis* L from 0.067 to 1,675 mg of total solids/mL and concentrations of *Aloe vera* L. gel from 0,09 to 1,00 mg of total solids/mL were evaluated in the *in vitro* test with *Aspergillus nidulans* D-30 fungus (mitotic segregation). Doses of 500, 1000 and 2 000 mg/kg of body weight were assayed for *Cassia grandis* L. and for *Aloe vera* L. gel in the *in vivo* micronucleus induction assay. None of the 2 phytodrugs produced either cellular damage or genotoxic activity in the genotoxic assays.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL; PLANT EXTRACTS/genetic; PLANT EXTRACTS/toxicity; IN VITRO; ASPERGILLUS NIDULANS; MICE; MEDICINE; HERBAL; ALOE/genetic; ALOE/toxicity; MUTAGENICITY TESTS; MICRONUCLEUS TESTS.

Cuba posee una flora rica en plantas medicinales, estos fitofármacos experimentan cada día un incremento en la preferencia del consumo nacional, como también en los países en vía de desarrollo y desarrollados. En muchos países esta

tendencia ha adquirido un auge significativo en los últimos años como valiosa alternativa para ser combinada o no con la terapia convencional. Por esta razón los estudios genotóxicos de los fitofármacos son esenciales para

¹ Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar.

² Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

³ Licenciada en Microbiología.

⁴ Licenciada en Biología.

⁵ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

que puedan ser registrados y reconocidos como productos farmacéuticos y puedan ser consumidos por el humano. Muchos de los compuestos presentes en las plantas pueden presentar propiedades mutagénicas relacionadas con procesos de diferenciación celular, teratogénicos y alteraciones genéticas en la descendencia. En las regulaciones farmacéuticas se establecen los estudios genotóxicos de todos los medicamentos de origen vegetal. De tal forma se procedió a evaluar posible potencial genotóxico del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L.

La especie *Cassia grandis* L. es una planta medicinal perteneciente a la familia de las *Cesalpiniaceas*. En Cuba existen 6 especies arbóreas pertenecientes a dicha familia y se conoce con el nombre de cañandonga, caña fístula cimarrona.^{1,2} A esta planta se le atribuyen propiedades en medicina popular y tradicional como antianémica, antiasmática, mineralizante y sedante. Por vía tópica se prepara un ungüento a partir de las hojas y se utiliza para ataques de histeria, mientras que la pulpa se emplea para la anemia.^{3,4} Farmacológicamente se le ha demostrado actividad antibacteriana y antimicótica, es inactiva contra la *Candida albicans*.⁵ Esta planta contiene aloe-emodina (antraquinona), polisacáridos, alcaloides, esteroides, triterpenos, aceites esenciales, saponinas, aminas, magnesio, cobalto, hierro y níquel.

El *Aloe vera* L., es una planta ampliamente estudiada en relación a su uso terapéutico en humanos, pertenece a la familia *Liliaceae*, de la cual existen 180 especies, muchas procedentes del este y sur de África e introducida en Asia, Europa y América.^{6,7} Los productos elaborados a partir de esta planta, han sido bien estudiados desde el punto de vista farmacológico y se le ha comprobado propiedades como, antiviral, hipoglicémico,⁸ inmunomoduladora,⁹⁻¹¹ antiinflamatoria,¹² cicatrizante,¹³ etcétera. Comercialmente las hojas frescas del *Aloe vera* L. se emplean en la obtención del gel en la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos. Los componentes principales del gel de Aloe son: lecitina, polisacáridos del tipo glucomanano y pequeñas concentraciones de aminoácidos, minerales y ácidos orgánicos.^{14,15}

Los ensayos genotóxicos se comenzaron con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30, ensayo *in vitro* que detecta daño primario al ADN.¹⁶ Posteriormente se evaluó el extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. mediante el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, el cual detecta la presencia de aberraciones cromosómicas en eritoblastos en contacto con compuestos que inducen aneuploidía y clastogénesis.¹⁷

El objetivo del presente trabajo es determinar el posible efecto citotóxico y mutagénicos del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. con propiedades medicinales reconocidas, evaluándose las mismas en 2 sistemas

de ensayos a corto plazo: inducción de segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 y el ensayo de inducción de micronúcleos.

Métodos

MATERIAL VEGETAL

La *Cassia grandis* L. se recolectó en la zona de Bayamo entre los meses de enero y marzo de 1993 y su fruto fue secado y molido. A partir de ese material se preparó un extracto fluido por los métodos de percolación en solución hidroalcohólica. El *Aloe vera* L. se recolectó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena. Con sus hojas se preparó un gel líquido empleando un proceso tecnológico desarrollado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Las características físico-químicas del extracto fluido de la *Cassia grandis* L. son las siguientes: contenido etanólico, 62,7 %; sólidos totales; 6,7 %; presencia de azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, flavonoides y carbohidratos, para el gel de *Aloe vera* L.: contenido de sólidos totales, 0,52 - 0,60 %; polisacáridos totales, 0,2 - 0,4 %; antracén derivados totales, 0,52 - 0,75 %; pH, 4,13 - 4,27; densidad, 1,00; índice de refracción, 1,33.¹⁸⁻²¹

ENSAYO DE SEGREGACIÓN MITÓTICA

Como modelo biológico se empleó el diploide heterocigótico *Aspergillus nidulans* D-30,²² cepa sintetizada a través del ciclo parasexual. Se emplearon los haploides FGSC A593(a) y FGSC A594(b), provenientes del *Fungal Genetics Stocks Center*, Atlanta, USA. Esta cepa heterocigótica, presenta 4 marcadores recesivos para el color de los conidios. Las mutaciones presentes en la cepa son las siguientes: y A2(Ia) = amarillo; WA2(IIb) = blanco; WA2 (Villa) = amarillo carmelita; chaA1(VIIIb) = chartré.

Esto permite observar a simple vista la ocurrencia de segregación mitótica por la frecuencia de sectores, bandas o puntos coloreados en estado de homocigosis sobre un fondo de color verde-amarillo de conidiniación salvaje. Estas mutaciones pueden ocurrir debido a eventos tales como recombinación mitótica, no disyunción cromosómica y haploidización inducidos por agentes que atacan el aparato mitótico. El medio de cultivo empleado fue el medio completo (MC).²²

Los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad se ejecutaron por el método de incorporación en placa.²³ El extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. se añadieron al (MC) licuado a 45°C. Se prepararon placas para cada concentración y 4 placas se inocularon en punto al centro con conidios del hongo para determinar la toxicidad cuanti-

tativa transcurrida 72 h de incubación a 37 °C. Posteriormente se midieron los diámetros de las colonias para calcular el Índice de Toxicidad (IT), expresado como el porcentaje de reducción del diámetro de las colonias en relación al control negativo (solvente).

La genotoxicidad se evaluó incubando a 30 °C durante un período de 6-10 d las placas restantes sembradas con conidios de la cepa D-30 y entonces se llevó a cabo la observación y conteo de los sectores segregantes coloreados aparecidos en las colonias. Los eventos genotóxicos que conducen a la segregación somática están determinados por la frecuencia de sectores por colonias (FSC) y el índice de segregación mitótica inducida (ISMI).²⁴

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizo procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio de $25,00 \pm 3,69$ y de $22,03 \pm 1,35$ para la *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L., respectivamente.

Antes del experimento, los animales se sometieron y un período de adaptación de una semana en condiciones de humedad y temperatura convencionales. La alimentación consistió en ración peletizada y agua sin restricción.

Para ambos fitofármacos, se preparó un protocolo de trabajo de 5 grupos de 10 animales, de ambos sexos, un control negativo carboximetil celulosa, CMC, al 0,5 %, en donde se suspendió el polvo del fruto molido, de la *Cassia grandis* L. y agua destilada para el gel de *Aloe vera* L. un control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg pc) y 3 dosis (500, 1 000, 2 000 mg/kg pc). La administración del extracto fluido y del gel fueron por vía oral equivalente a 10 mL/kg pc, según los criterios de *Hayahi* y otros.²⁵ El esquema de tratamiento consistió en 2 administraciones separadas por un intervalo de 24 h y sacrificio por dislocación cervical después de la última administración.^{26,27} Las láminas se fijaron con etanol durante 5 min y se tiñeron con Giemsa al 5 % en agua corriente. Se contaron 2 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además los eritrocitos normocromáticos (NCE) observados por cada 250 PCE para determinar la citotoxicidad dada por la relación PCE/NCE (IT). La incidencia de micronúcleos (MN) se observaron en 2 000 PCE.

Para el análisis estadístico los valores de la relación PCE/NCE y el por ciento de PCE micronucleados (% mPCE) se normalizaron mediante la transformación $\sqrt{x + 1}$. Los valores se procesaron aplicando un análisis de varianza de 2 vías. Se tuvo en cuenta el sexo y las dosis empleadas mediante un paquete estadístico Microstat. La existencia de

una posible relación dosis-respuesta se verificó empleando la prueba de *Cochran-Armitage*.²⁸

Resultados

SEGREGACIÓN MITÓTICA EN *ASPERGILLUS NIDULANS* D-30

En la tabla 1 se muestran los resultados de 3 experimentos del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y del gel de *Aloe vera* L. Para la *Cassia grandis* L. se aprecia una ligera citotoxicidad hasta concentraciones de 1,005 mg/mL de sólidos totales, perdiéndose ésta a concentraciones de 1,340 a 1,675 mg/mL de sólidos totales, como lo demuestra el signo negativo del índice de citotoxicidad (% IT), respecto al control negativo (solvente). Para el gel de *Aloe vera* L., no se aprecia ningún signo de citotoxicidad en ninguna de las concentraciones ensayadas, observándose un incremento en el crecimiento de las colonias del hongo *Aspergillus nidulans* hasta concentraciones de 1,00 mg/mL de sólidos totales dado por un aumento negativo del % IT.

Con relación al daño genético, en ninguno de ambos fitofármacos no se observa en la tabla 1 un efecto concentración-dependiente significativo en la FSC ($p = 0,99$; $p = 0,55$), tanto para la *Cassia grandis* L. como para el *Aloe vera* L. El experimento se repitió 3 veces.

ENSAYO DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos para esta prueba *in vivo*. En el caso del gel de *Aloe vera* L., la relación PCE/NCE, indicadora de citotoxicidad medular no mostró diferencias significativas para ratones machos ($p = 0,70$), ni para ratones hembras ($p = 0,89$). El valor del % mPCE, indicador de daño genético, no presentó diferencias significativas respecto al control negativo, para ratones machos ($p = 0,99$), ni para ratones hembras ($p = 0,73$). La regresión *Cochran-Armitage*, tampoco resultó significativas $P_{(machos)} = 0,58$; $P_{(hembras)} = 0,79$. Para la *Cassia grandis* L., tampoco se detectó daño citotóxico, al no observarse significación estadística entre sexo ($p = 0,49$), para las dosis ensayadas ($p = 0,43$). No se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a sexo ($p = 0,47$), y dosis ensayadas ($p = 0,65$) en relación al indicador de genotoxicidad (% MNPCE). La regresión de *Cochran-Armitage* no resultó ser significativa para ambos sexos ($p = 0,32$).

TABLA 1. Resultados de la segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 frente al extracto fluido de *Cassia grandis* L. (ferroscasia) y el gel de *Aloe vera* L.

Concentración mg/mL	Colonias	Toxicidad ^a (IT %)	Colonias	Genotoxicidad Segregantes	FSC	ISMI ^b
<i>Cassia grandis</i> L.						
Etanol 1,6 % ^c	24	-	44	66	1,50	-
0,067	24	- 3,80	42	68	1,62	0,08
0,335	24	3,30	44	56	1,27	0,85
0,536	24	4,00	45	67	1,35	0,90
0,670	24	3,30	45	61	1,35	0,90
1,005	24	1,00	45	62	1,42	0,95
1,340	24	- 1,50	43	61	1,42	0,95
1,675	24	- 2,00	43	69	1,60	1,07
Metilmetano sulfonato 2,40 mM ^d	24	56,60**	44	187	4,25	2,83**
<i>Aloe vera</i> L.						
Agua destilada estéril ^c	12	-	34	59	1,73	-
0,9	12	- 2,27	33	47	1,42	0,82
0,18	12	- 2,27	33	48	1,45	0,84
0,36	12	- 6,82	33	50	1,51	0,87
0,54	12	- 2,27	34	68	2,00	1,56
0,72	12	- 6,82	34	46	1,35	0,78
1,00	12	- 6,82	35	61	1,74	1,00
Metilmetano sulfonato 2,40 mM ^d	12	34,09**	35	285	8,14	4,70**
Espontáneo	24	- 3,75	44	49	1,11	0,74

^a Reducción del diámetro de las colonias las 72 h de incubación respecto al control negativo.

^b Índice de segregación mitótica.

^c Control negativo.

^d Control positivo.

** p < 0,01.

TABLA 2. Ensayo de micronúcleos en ratones tratados con Gel de *Aloe vera* L.

Dosis (mg/kg/d)	Sexo ^a	PCE/NCE (media ± DS)	MNPCE/1000 PCE (media ± DS)
Agua destilada ^c	M	2,33 ± 0,43	0,80 ± 0,08
	F	2,24 ± 0,22	1,00 ± 0,15
500	M	2,06 ± 0,51	0,70 ± 0,09
	F	2,06 ± 0,43	0,70 ± 0,09
1 000	M	2,09 ± 0,39	0,70 ± 0,05
	F	2,19 ± 0,47	0,90 ± 0,13
2 000	M	2,27 ± 0,29	0,70 ± 0,13
	F	2,13 ± 0,19	0,60 ± 0,08
CP 20 ^d	M	0,67 ± 0,06**	20,50 ± 0,70**
	F	0,65 ± 0,04**	23,80 ± 1,10**

^a M, machos; F, hembras, positivo

^b PCE micronucleados.

^c Control negativo

^d Ciclofosfamida, control.

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

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

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

TABLA 3. Resultados del ensayo de micronúcleos en ratones tratados con una suspensión del polvo de *Cassia grandis* L.

Tratamientos	Animales	IT ± DS ^a	PCE		
			Analizados	mPCE	% mPCE ± DS ^b
Control					
CMC 0,5 % ^c	10	1,67 ± 0,15	20 000	15	0,075 ± 0,06
No tratados	10	1,57 ± 0,09	20 000	16	0,080 ± 0,05
Ciclofosfamida ^d					
20 mg/kg/d	10	1,12 ± 0,06*	20 000	49	2,40 ± 0,26**
Dosis					
mg/kg/d					
<i>Cassia grandis</i> L.					
500	10	1,64 ± 0,09	20 000	19	0,095 ± 0,068
1 000	10	1,69 ± 0,05	20 000	14	0,070 ± 0,048
2 000	10	1,69 ± 0,07	20 000	19	0,095 ± 0,049

^a PCE/NCE = Índice de citotoxicidad.

^b % de eritrocitos policromáticos micronucleados.

^c Control negativo.

^d Control positivo.

** p < 0,05.

Valor de *Cochran/Armitage*, p = 0,318.

Discusión

La ausencia de citotoxicidad del gel de *Aloe* y el incremento del diámetro de las colonias en el hongo *Aspergillus nidulans*, en el ensayo *in vitro* de segregación mitótica, puede deberse a algunas sustancias, tales como vitaminas, aminoácidos, azúcares, esteroides, saponinas, etc. que se reportan en el gel de *Aloe*, las cuales pueden favorecer la germinación y el desarrollo de las colonias, favoreciendo el crecimiento micelial, tener una acción citoprotectora o ser antagonista de algún inhibidor de la germinación en el hongo *Aspergillus nidulans*.²⁹ En el caso del extracto fluido de la *Cassia grandis* L., la baja citotoxicidad observada dentro del rango de concentraciones desde 0,335 a 1,00 mg/mL de sólidos totales en el MC tiende a desaparecer cuando estas se incrementan a valores desde 1,340 y 1,675 mg/mL, posiblemente porque los polisacáridos, azúcares reductores aminoácidos, taninos, etc., favorezcan el desarrollo micelial del hongo y que al igual que en el gel de *Aloe vera* L., los posibles componentes citoprotectores presentes en el extracto fluido estén en una concentración más alta que los compuestos que pudieran ejercer el débil efecto citoprotector, ya que el etanol no es el responsable de esa acción tóxica, pues se encuentra dentro de los niveles permisibles (hasta 2 % v/v).²⁹

La ausencia de daño genético *in vitro* de ambos fitofármacos, demuestran que no contienen genotoxinas que alteren el genoma celular de la cepa diploide *Aspergillus nidulans* D-30. Tampoco en el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos se obtuvo una respuesta positiva tanto para el gel de *Aloe vera* L. como para la *Cassia grandis* L., como era de esperarse.

Conclusiones

El extracto fluido y la suspensión de la *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. no presentaron acción genotóxica ya que:

- No indujo un incremento significativo concentración-dependiente en la frecuencia de sectores por colonias en el ensayo *in vitro* de segregación mitótica en la cepa *Aspergillus nidulans* D-30.
- En el ensayo *in vivo* de incubación de micronúcleos en médula ósea de ratón no se observó un efecto dosis-dependiente significativo ni ninguna tendencia lineal de incremento en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos. Tampoco se observó daño medular al no existir diferencias significativas en la relación PCE/NCE para las dosis ensayadas.

Referencias bibliográficas

1. Bisse J. árboles de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:106-7.
2. Roig JT. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:246.
3. Gupta MP. 270 Plantas Iberoamericanas. Panamá: Editorial CYTED-SECAB, 1995:356-57.
4. Valencia E, Madinavertia A, Bermejo I, González A, Gupta M. Alkaloid from *Cassia grandis*. *Fitoterapia* 1995;66(5):476-7.
5. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Universidad de San Carlos. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996:115-6.
6. Agarwala OM. Whole leaf Aloe gel vs standard Aloe gel. *Drug Com Ind* 1997:22-4.
7. Dixit UP. Effect of Ale Barbadosensis on serum lipids in triton-induced hyperlipidaemia in Prebestis Monkey. *Indian J Med Res* 1983;78:417-21.
8. Michael P. Prospective study of the immunomodulator properties intramuscular administered "Alua" extract in patients with solid tumor under a course of chemical immunosuppressive therapy. *Arch Inst Pasteur* 1989;56(1):253-9.
9. Hart IA. Anti complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the parenchyma of gel Aloe vera. *Plant M ed* 1989;55(6):509-12.
10. Degtiarenko TU. Primary screening of the immunopharmacologic activity of the Filatov tissue therapy preparations. *Oftalmol. No. 1* 1989;2(1):288-94.
11. Davis RH. Processed Aloe vera administrated topically inhibits inflammation. *J Am Pediatr Med Ass* 1989;8:395-7.
12. Kaufman T. Aloe vera gel hindered wound healing of experimental second-degree burns: a quantitative controlled study. *J Burn Care Rehabil.* 1988;9(2):156-89.
13. Larinova M. Estudio comparativo de las hojas y extractos de Aloe barbadensis y Aloe arborencens. Parte V. Actividad cicatrizante y compuestos antraquinónicos. *Rev Cubana Farm* 1989;23(3):270-77.
14. Mandal G. Structure of glucomannan isolated from the leaves of Aloe barbadensis. *Carbohydrates.* 1980;87:249-56.
15. Käfer E, Scott B, Kappas A. Systems and results of test chemical induction malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1986;167:9-34.
16. Garriot M, Piper C, Kokino A. A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assay. *Apply Toxicol* 1988;9:141.
17. Fajardo D, Díaz M, Galup O, Rosado A. Algunos aspectos sobre la composición química y posibles aplicaciones del Aloe. *Rev CENIC (Ciencias Químicas)* 1988;19:97-102.
18. Prakash A. Whole leaf Aloe gel vs standard Aloe gel. *Rev Drug Cosmetic Ind* 1997:22-6.
19. Aloe vera gel. WHO Monographs on selected medical plants. Geneva, 1998;1.
20. Hart LA, Enkevort PH Van, Dijk H van, Zaat R, Silva de K, Labadie RP. Two functionally and chemically distinct immunomodulatory compounds in the gel of Aloe vera. *J Ethnopharmacol* 1988;23:61-71.
21. Käfer E. Test which distinguish induced crossing-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus nidulans* treated with choral hydrate an ray. *Mutat Res* 1986;164:145-66.
22. Scott B, Käfer E. *Aspergillus nidulans*: an organism for detecting a range of genetic damage. En: De Serre FJ, Hollaneder A, eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* New York: Plenum, 1982:189-97.
23. Kappas A, Geogopoulos G, Hastie A. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on dipliod *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 197;26:17-27.
24. Ramos A, Torre RA de la, Alonso N, Villaescusa A, Vizoso A, Betacourt J. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *J Ethnopharmacol* 1996;521:123-7.
25. Hayashi M, Tice R, Mac Gregor J, Anderson D, Blakey D, Kirshvolders, et al. In vivo rodents erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994;312:293-304.
26. Schimid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A, eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* New York: Plenum, 1976:31-53.
27. Mavournin K, Blakcy D, Cimino M, Salamone M, Heddle J. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of USA EPA Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990;239:29-30.
28. Lovell D, Albanese R, Clare G, Richold M, Savage J et al. Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays. En: Kirland D, ed. *Statistical evaluation of mutagenicity test data.* Cambridge: University, 1989:184-230.
29. Kappas A. On the mechanisms of induced aneuploidy in and validation of test for genomic mutation. *Prog Clin Biol Res* 1989;377:84.

Recibido: 3 de mayo del 2000. Aprobado: 7 de septiembre del 2000.
Lic. Ángel 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.