

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)
Departamento de Investigaciones Microbiológicas

ESTUDIO TOXICOGENÉTICO DE UN POLISACÁRIDO DEL GEL DE ALOE VERA L.

Lic. Arilia García López,¹ Lic. Angel Vizoso Parra,² Lic. Alberto Ramos Ruiz,³ Lic. Janet Piloto Ferrer,⁴
Lic. Vania Pavón González⁵ y Lic. Eduardo A. Rodríguez Leyes⁵

Resumen

Se presentan los resultados obtenidos al evaluar el potencial toxicogenético de un liofilizado de polisacárido previamente dializado obtenido a partir de gel de *Aloe vera* L. en 2 sistemas de ensayos a corto plazo, empleando un modelo *in vitro*: el sistema Salmonella/microsoma (*Ames*) y otro *in vivo*: el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de *Ames* se testaron las cepas TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537, de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica (S9) en el rango de concentraciones de 50, 150, 500 y 1500 µg/placa. En el ensayo de inducción de micronúcleos se ensayaron dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal (pc). Los resultados obtenidos demostraron que el polisacárido de gel de *Aloe* no fue mutagénico en el sistema Salmonella/microsoma. En el ensayo *in vivo* no se observó respuesta genotóxica en las dosis estudiadas.

DeCs: ALOE/toxicidad; PLANTAS MEDICINALES; POLISACARIDOS; EVALUACIÓN DE MEDICAMENTOS; TEST DE MUTAGENICIDAD; TESTS DE MICRONUCLEOS; RATONES.

Summary

The authors present the results obtained on assessing the toxicogenetic potential of a polysaccharide freeze-dried, previously dialysed, obtained from *Aloe vera* L. gel in 2 short-term assay systems by using an *in vitro* model: the Salmonella/microsome system (*Ames*), and another *in vivo*: the micronucleus induction assay in mouse bone marrow. In the assay of *Ames*, we tested TA 100, TA 98, TA 1535 and TA 1537 strains of *Salmonella typhimurium* with and without metabolic activation (S9) within a concentration range of 50, 150, 500 and 1 500 µg/plate. In the micronucleus induction assay, we tested doses of 500, 1 000 and 2 000 mg/kg of body weight. The results obtained showed that the polysaccharide from *Aloe* gel was not mutagenic in the Salmonella/microsome system. No genotoxic response was observed in the doses studied in the *in vivo* assay.

Subject headings: GELS; ALOE/toxicity; PLANTS, MEDICINAL; POLYSACCHARIDES; DRUG EVALUATION; MUTAGENICITY TESTS; MICRONUCLEUS TESTS; MICE.

Los estudios toxicogenéticos ocupan un lugar imprescindible en la evaluación de fitofármacos con actividad terapéutica, ya que se encargan de investigar la probable inducción de daños genéticos, como consecuencia de los cuales pueden ocasionar enfermedades, tales como desarrollo de

procesos tumorales, transmisión de alteraciones genéticas a la descendencia y malformaciones congénitas¹⁻³.

El gel de *Aloe vera* L ha sido un componente fundamental de cosméticos y productos de cuidado personal por todo el mundo durante varios años. La actividad biológica de este

¹ Licenciada en Microbiología.

² Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.

³ Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

⁴ Licenciada en Biología.

⁵ Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

material se ha adscrito a los carbohidratos (polisacáridos), fracción que está compuesta por aproximadamente 20 % de los sólidos totales en las hojas del *Aloe*. Además se ha demostrado que unas 20 proteínas de distintas clases, asociadas con el polisacárido, contribuyen a la actividad farmacológica del gel de *Aloe* en la estimulación de la proliferación celular y otras posibles actividades tales como: antiinflamatoria, antiviral, inmunomoduladora de la actividad de *Acemannan*, antihepatitis antineoplásicas, antiulcerativas, como enemagogo, purgativo y vermífugo; externamente se usa para cicatrizar heridas, desinfectante y astringente. Se reporta un producto patentado, denominado *Carrisyne*^{MB} del cual se ha demostrado su actividad en la estimulación de la reproducción y fibroblastos en los cultivos de tejidos hasta un 300 % en 48 h. Estos fibroblastos juegan un papel fundamental en la cicatrización de quemaduras, heridas, úlceras y membranas gastrointestinales.⁴⁻⁸

Los estudios genotóxicos se llevaron a cabo empleando 2 sistemas de ensayo a corto plazo reconocidos internacionalmente, uno *in vitro*, el ensayo de Salmonella/Microsoma (*Ames*) que detecta mutaciones puntuales y un ensayo *in vivo*, la prueba de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón que evidencia si existe daño cromosómico.

Métodos

MATERIAL VEGETAL

La planta se cultivó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena, La Habana. Un ejemplar de la planta se conserva en el herbario de dicha institución con el número Roig 4591. El polisacárido se obtiene por precipitación etanólica del gel elaborado a partir de las hojas frescas de *Aloe vera* L. Las especificaciones para el crudo etanólico de polisacárido son las siguientes: carbohidratos totales 20,74 %, antracenderivados totales 42,1 mg/100g; humedad 43,5 %. El crudo dializado y liofilizado tiene un contenido de carbohidratos totales expresados como manosa en un 44,34 %.

ENSAYO DE SALMONELLA/MICROSOMA (AMES)

Se empleó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, TA-1535, TA 1537, TA-98 y TA-100, donadas por el Dr. Bruce N Ames (Universidad de California en Berkeley, EUA). Se empleó el método de incorporación en placa con un protocolo de trabajo bien estandarizado.⁹ Se ensayaron concentraciones de 50, 150, 500, 1 5000 y 5 000 µg/placa de sólidos totales, sembrándose 3 placas por concentración en un experimento único. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de activación metabólica exógena, conteniendo 10 % de fracción S9 en solución de co-factores, obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital

y 5,6 nafto flavona.^{10,11} Las placas se incubaron a 37 °C y se contaron las colonias revertantes a las 48 h. Para el análisis estadístico se aplicó el programa SALANAL (Salmonella Assay Analysis. Versión 1. US Environmental Protection Agency).

ENSAYO DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS

Se pesaron 2 000 mg del liofilizado de polisacáridos del gel de *Aloe* y se disolvieron en 10 mL de agua destilada estéril para obtener una concentración de 200 mg/mL de sólidos totales en el momento de la administración a los animales. Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizo, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio de $21,8 \pm 1,6$ g y con 5 semanas de nacidos. Previo al experimento, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana en condiciones de temperatura y humedad convencionales. La alimentación consistió en ración peletizada y agua sin restricción. Se establecieron 5 grupos experimentales: control negativo (agua destilada), un control positivo (Mitomicina C, 2 mg/kg de pc en dosis única, 24 h antes del sacrificio) y 3 dosis (500, 1 000 y 2 000 mg/kg de pc),^{12,13} cada grupo estuvo representado por 10 animales 5 de cada sexo. La vía de administración fue oral a razón de 10 mL/kg de pc en dosis separadas por 24 h. El sacrificio de los animales, el muestreo, procesamiento y evaluación de las extensiones de médula ósea se realizó de acuerdo a la metodología establecida.¹⁴ El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando la transformación $\sqrt{(X + 1)}$ al por ciento de eritrocitos policromáticos micronucleados (% MPCE) y posteriormente se aplicó un Anova simple para los ratones machos y hembras empleando el paquete estadístico MICROSTA.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo de Salmonella/microsoma. Como puede apreciarse hasta valores de 5 mg/placa (valor que se acepta como máximo de exposición en dependencia de la solubilidad del producto y de la toxicidad)¹⁵ no se observó un aumento significativo del número de revertantes con respecto al control negativo, ni presentó una relación dosis-relación significativa, para las concentraciones ensayadas en cada una de las cepas.

Los resultados del ensayo de inducción de micronúcleos *in vivo* aparecen en la tabla 2. No se observaron incrementos significativos para la relación PCE/NCE (indicadora de citotoxicidad medular), ni para ratones machos ($P = 0,251$), ni ratones hembras ($P = 0,02$). El valor del por ciento de eritrocitos policromáticos (% MNPCE) parámetro de daño clastogénico y aneugénico no presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo, ni para ratones machos ($P = 0,669$) ni ratones hembras ($P = 0,320$). Tampoco el estadígrafo *Cochran-Armitage* para pruebas de tendencias en las proporciones lineales en el valor de MNPCE respecto a las dosis estudiadas demostraron resultados significativos en cada caso ($P_{machos} = 0,650$; $P_{hembras} = 0,534$).¹⁶

TABLA 1. Resultados del ensayo de Ames frente al polisacárido del gel de *Aloe*.

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± D.S			
	TA-98		TA-100	
	(+ S9)	(- S9)	(+ S9)	(-S9)
0 ^a	32,33 ± 4,04	27,67 ± 0,58	185,00 ± 6,93	163,67 ± 2,08
50	35,33 ± 4,62	27,67 ± 2,31	186,00 ± 3,20	167,33 ± 2,08
150	29,33 ± 1,15	26,67 ± 2,08	188,33 ± 40,07	170,67 ± 4,62
500	30,67 ± 1,53	27,33 ± 1,53	184,67 ± 7,64	168,00 ± 4,36
1 500	31,67 ± 1,53	26,00 ± 1,00	181,33 ± 3,21	171,67 ± 8,62
5 000	32,67 ± 2,52	27,33 ± 1,53	181,33 ± 10,02	167,00 ± 2,65
Control positivo ^b	1 692,66 ± 126,00	786,66 ± 135,49	536,00 ± 69,39	686,00 ± 210,81
P(^c)	0,346	0,545	0,401	0,858

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± D.S			
	TA-1535		TA-1537	
	(+ S9)	(- S9)	(+ S9)	(-S9)
0 ^a	13,67 ± 0,58	16,00 ± 1,00	6,33 ± 0,58	8,00 ± 0,00
50	14,67 ± 2,08	17,67 ± 1,53	6,67 ± 1,53	7,67 ± 2,08
150	15,00 ± 2,65	13,67 ± 0,58	8,00 ± 1,00	8,67 ± 1,53
500	14,67 ± 0,58	15,33 ± 2,08	8,33 ± 1,15	8,67 ± 1,53
1 500	14,33 ± 3,06	15,67 ± 0,58	9,00 ± 1,00	8,67 ± 1,15
5 000	14,33 ± 0,58	15,67 ± 0,58	7,00 ± 1,00	9,33 ± 1,15
Control positivo ^b	623,00 ± 71,35	345,66 ± 47,18	1137,33 ± 79,00	894,67 ± 147,09
P(^c)	0,837	0,990	0,403	0,911

^a Control negativo: agua destilada estéril

^b Control positivo

TA-1535 (+S9) ciclofosfamida, 500 µg/placa. TA-1537 (+S9) 2 aminofluoreno, 100 µg/placa.
 (-S9) ázida de sodio 1,5 µg/placa. (-S9) 9-aminoantraceno, 100 µg/placa.

TA-98 (+S9) 2-aminofluoreno, 10 µg, TA-100 (+S9), benzo, 10 µg/placa.
 (-S9) ácido pricrolónico, 100 µg/placa. (-SA) ázida de sodio, 1,5 µg/placa.

^c Significación estadística de la relación dosis-respuesta.

Discusión

Como se demuestra, el polisacárido del gel de *Aloe* no induce efecto mutagénico en los sistemas toxicogenéticos empleados. Esta ausencia de mutagenicidad pudiera explicarse por 2 razones: La primera es que el crudo etanólico de polisacárido contiene derivados antracénicos; los cuales se reportan como antimutagénicos *in vitro* y *ex vivo* frente a aminas heterocíclicas relacionadas con la inactivación de determinadas enzimas de la familia CPY-1, que pueden activar determinados promutágenos.^{17,18}

La segunda razón es que existen reportes que demuestran que el polisacárido del gel de *Aloe* puede estimular el sistema inmune como se ha demostrado en células de piel después de ser tratada con luz ultravioleta tipo B. Otra vía que pudiera explicar la ausencia de daño genético y teniendo en cuenta su acción protectora contra la radiación UV es que active los mecanismos de escisión por reparación o reparación recombinacional, dicho de otro modo por un proceso bioantimutagénico.¹⁹

También se ha demostrado que los polisacáridos de gel de *Aloe* ejercen un efecto inhibitorio en la formación de

TABLA 2. Ensayo de micronúcleos en ratones tratados con polisacárido del gel de Aloe

Dosis (mg/kg/día)	Sexo ^a	PCE/NCE (media ± DS)	MNPCE/1 000 PCE (media ± DS) ^b
Agua destilada estéril ^c	M	2,23 ± 0,35	1,70 ± 0,75
	F	2,05 ±	0,101,80 ± 0,44
500	M	2,16 ± 0,15	1,20 ± 0,44
	F	2,20 ± 0,21	1,20 ± 0,57
1 000	M	2,24 ± 0,08	1,20 ± 0,57
	F	1,99 ± 0,04	1,40 ± 0,22
2 000	M	2,00 ± 0,18	9,00 ± 1,70
	F	2,23 ± 0,12	1,60 ± 0,65
Mitomicina C 20 ^d	M	0,63 ± 0,03	22,20 ± 6,20**
	F	0,66 ± 0,07	23,80 ± 9,50**

^a M, machos, F, hembras.

^b PCE micronucleados.

^c Control negativo

^d Mitomicina C, control positivo.

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

Cochran-Armitage, p = 0,40 (M)

Cochran-Armitage, p = 0,82 (F)

aductos de ADN con el benzo (a) pireno tanto *in vitro* como *in vivo*, por otro lado, el daño oxidativo al ADN inducido por la 8-hidroxideoxiguanosina fue significativamente por polisacáridos del *Aloe barbadensis* Miller. ⁸

En conclusión el polisacárido de gel de *Aloe* es un producto obtenido del *Aloe Vera* L. Y con propiedades farmacológicas reconocidas no presenta efecto genotóxico en los sistemas ensayados. Los resultados obtenidos coincidentes con los reportes de otros autores, nos hacen pensar la posible actividad antigenotóxica y antitumoral de este producto, el cual pudiera ser considerado como un agente potencial en la quimiopreención del cáncer.

Referencias bibliográficas

- Madrigal-Bujaidar E, Barriga D, Mata P, Guzmán R, Cassani M. Sister chromatid exchange induced *in vivo* by extract of Black pepper. *Food Chem Toxicol* 1997;35:567-71.
- Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, López M, Décalo M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *J Ethnopharmacol* 1998;61:49-55.
- Ames NA. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983;221:1256-64.
- Davis RH. *Aloe vera*: new products for the cosmetics and pharmaceutical industry. In *Aloe vera* Congress. Summary's Book. 1998.
- Propiedades de los constituyentes del *Aloe barbadensis* Miller. Disponible en: <http://www.Aloe-vera.co.uk/aloe-prop.htm>. 1999.
- Ross et al. Quantitative analysis of *Aloe vera* L mucilagenosus polysaccharide in commercial *Aloe vera* L. products. *J Abac Int* 1997;80:314-7.
- Mac Anally BH. Processes for preparations of *Aloe* products. Products produced thereby and composition thereof. Patent Number 4917890.U.S.A. 1990.
- Hyung SK, Sam K, Byung ML. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides. (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis* 1999;20:1637-40.
- Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, et al. Report from working group on bacterial mutation assays: International Workshop on standarization of Genotoxicity by Test Procedure. *Mutat Res* 1994;312:217-33.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173-215.
- Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimuta T. A safe substitute for polychlorinate biphenols as an inducer of metabolic activation system. En: De Serres FJ, Font JR, bend JR, Philpot RM. *In vitro* metabolic activation in mutagenesis testing. Amsterdam: Elsevier, 1976:85-8.
- Hayashi M, Tice R, MacGregor JT, Anderson D, Bladley DH, Kirsh-Volders M, et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994;312:293-304.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle J. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US EPA Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990;239:29-80.
- Ramos A, Villaescusa A, Vizoso A. Ausencia de genotoxicidad en extractos fluidos de *Ortosiphom aristatus Blume* (té de riñón) y *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo). *Rev Cubana Plant Med* 1996;2:35-8.
- Gatehouse D, Howorth S, Cebula T, et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res* 1994;312: 217-33.
- Lovell D, Albanese R, Clare G. Statistical analysis of *in vivo* cytogenetic assays. En: Kirland DL, ed. *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge:Cambridge University, 1989:184-230.
- Brown JP, Dietrch PS. Mutagenicity of anthranquinone and benzathrone derivatives in *Salmonella*/Microsoma test. Activation of antraquinona glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacterial. *Mutat Res* 1979;66:9-24.
- Bu Abbas A, Joannides C, Walter R. Evaluation of the antimutagenic potential of anthracen *in vitro* and *in vivo* studies. *Mutat Res* 1994;309:101-7.
- Kayoko S, Yoshiyuki N, Isao T, Tsuneo K. Bioantimutagenic effect of tanic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *E. coli* B/r. *Mutat Res* 1985;149:17-23.

Recibido: 17 de noviembre del 2000. Aprobado: 4 de enero del 2001.
Lic. Arilia García López. Ave. 26 No. 1605 entre Cerro y Boyeros.
Plaza. Ciudad de La Habana. CP 10600.